


VE
RI
TAS

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

SCEAUX. — IMPRIMERIE CHARAIRE.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

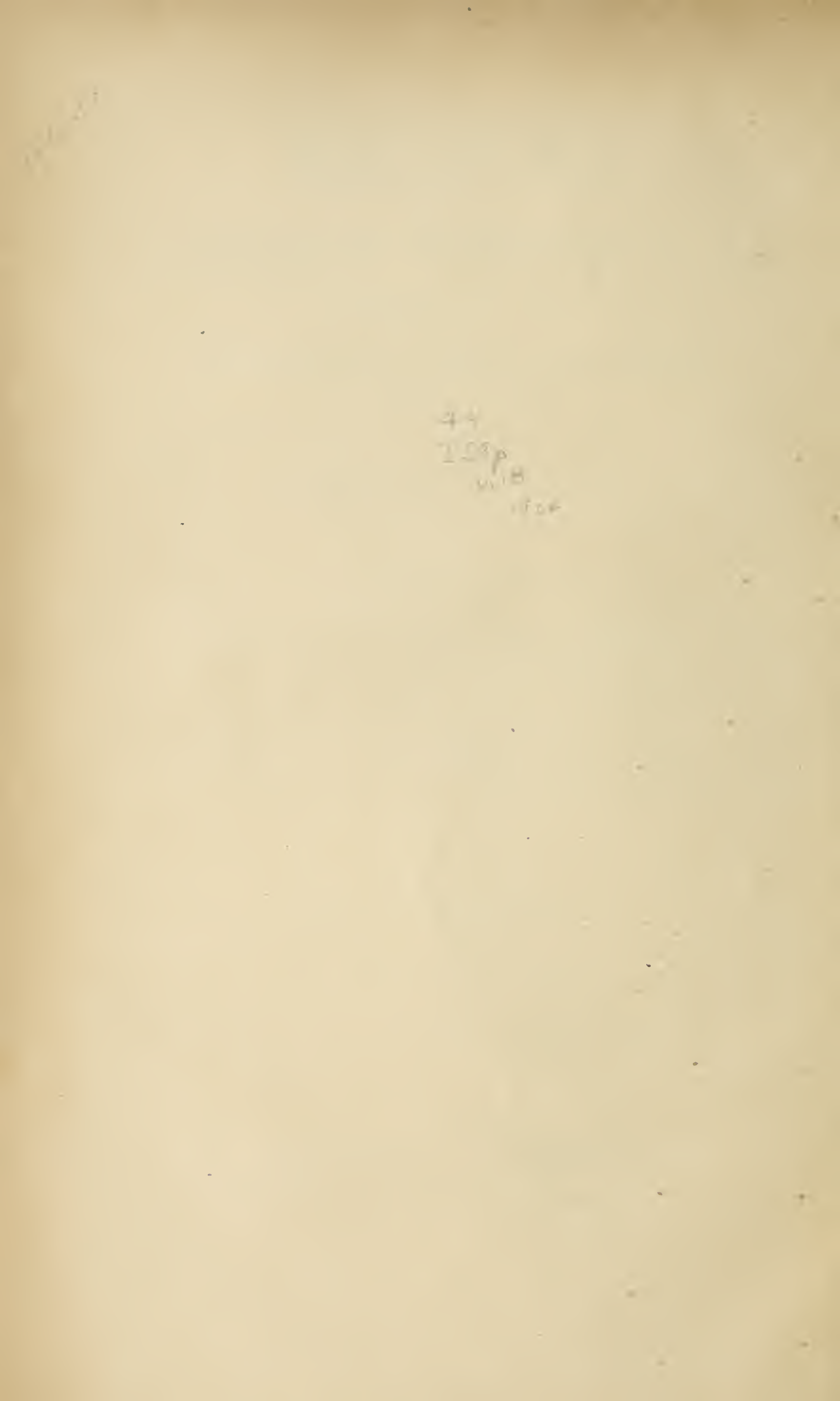
ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

TOME DIX-HUITIÈME
1904
AVEC NEUF PLANCHES

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN



18me ANNÉE JANVIER 1904 N° 1

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Etudes expérimentales sur la Syphilis

PAR
EL. METCHNIKOFF ET EM. ROUX.

DEUXIÈME MÉMOIRE.

Il a été démontré dans notre premier mémoire (ces *Annales*, 1903, p. 809), que le chimpanzé est sensible au virus syphilitique, qui produit chez cette espèce de singe anthropoïde des accidents primaires et secondaires tout à fait comparables à ceux de l'homme. Tout récemment M. *Lassar* [1], de Berlin, a confirmé ce fait, en reproduisant la syphilis chez un chimpanzé mâle. Après avoir inoculé, à plusieurs endroits de la face et aux oreilles, du virus syphilitique provenant d'un chancre induré du bras, non traité, il a observé l'apparition d'accidents primaires et secondaires. 14 jours après l'inoculation, le chimpanzé présenta plusieurs chancres indurés aux points d'introduction du virus. Quelque temps après, sur plusieurs endroits du corps et, notamment, sur les faces palmaires et plantaires, apparurent des papules syphilitiques caractéristiques.

Cette expérience de M. *Lassar* et les deux que nous avons publiées, montrent que sur trois chimpanzés inoculés de syphilis, tous ont été pris d'accidents comparables à ceux de l'homme. Le doute n'est donc plus possible : le chimpanzé est une espèce animale qui prend la syphilis et qui par conséquent peut être d'une grande utilité pour l'étude de cette maladie. Le problème si patiemment recherché de la syphilis expérimentale, doit donc être considéré comme résolu.

1. *Berliner klin. Wochenschr.* 1903, n° 52, p. 1189.

Jusqu'à quel point les syphiligraphes tiennent à avoir un animal sensible à la syphilis, c'est ce qui résulte du dernier travail de M. *A. Neisser*[1], exécuté en collaboration avec M. Veiel. Après avoir tenté, sans succès, de suspendre l'immunité naturelle des porcs au moyen de la phloridzine ou de l'alcool[2], *Neisser* et *Veiel* ont essayé de donner la syphilis à des porcs et à un singe, traités par des sérums anticytasiques (ou anticomplémentaires). Le point de départ de leurs expériences est le fait établi par *Wassermann*, à savoir que des cobayes, traités par ces sérums et inoculés avec des bacilles typhiques, succombaient à une infection généralisée, tandis que les animaux témoins, c'est-à-dire traités avec du sérum normal, résistaient aux mêmes doses de virus.

Entre la maladie expérimentale, provoquée par l'injection de bacilles typhiques à des cobayes, et la syphilis, il y a cependant cette grande différence que l'incubation est beaucoup plus longue dans le dernier cas. Tandis que la syphilis ne se déclare que quelques semaines après l'infection, la septicémie typhique des cobayes évolue en moins de 24 heures. Il était donc à prévoir que l'introduction de ces sérums anticytasiques ne pouvait en rien affaiblir la résistance de l'organisme. Loin de là, l'animal réfractaire, habitué à l'action de sérums, verrait plutôt son immunité renforcée. Aussi, dans les expériences de *Neisser* et *Veiel*, les porcs et le singe (*Macacus pileatus*) n'ont manifesté aucun symptôme syphilitique, malgré l'introduction dans leur corps de très grandes quantités de virus.

Le résultat négatif de l'inoculation de la syphilis à un singe, enregistré par *Neisser* et *Veiel*, vient s'ajouter à un grand nombre d'autres tentatives infructueuses. Dans nos propres expériences, sur 9 macaques inoculés superficiellement par scarification avec du virus syphilitique provenant de chancres indurés, 4 seulement ont manifesté quelques accidents passagers. Deux *Macacus sinicus* ont présenté des lésions légères, comparables à celles décrites par *Ch. Nicolle* (ces *Annales*, 1903, p. 636). Chez un de ces animaux, l'arcade sourcilière inoculée est devenue le siège d'une lésion superficielle et typique; sur la lèvre supérieure, inoculée avec le même virus, ont

1. *Deutsche medic. Wochenschr.* 1904, n° 1, p. 22.
2. *Archiv f. Dermatologie u. Syphilis.* 1902, t. LIX.

apparu deux petites papules très caractéristiques. Développées sous forme de deux taches rouges, du diamètre d'une gosse tête d'épingle, ces papules ont montré à leur centre des petites squames. Les accidents primaires guérirent en peu de temps et ne furent suivis d'aucun accident secondaire.

Deux *Macacus cynomolgus* ont manifesté également des accidents très légers de nature syphilitique. Une femelle, inoculée à la lèvre supérieure et à l'arcade sourcilière gauche, avec du virus provenant d'un chancre induré récent et n'ayant subi aucun traitement, a présenté 27 jours plus tard une lésion superficielle. Il s'est formé sur l'arcade sourcilière inoculée une série de points hypérémiés qui se sont réunis eu un bourrelet tuméfié, dont le centre s'est bientôt couvert d'une croûte très mince. Cet état n'a duré que peu de temps. Déjà le 4e jour la lésion est devenue plus pâle et moins enflée, et la guérison définitive s'est faite bientôt après. La lèvre inoculée n'a présenté aucun symptôme morbide; les ganglions lymphatiques n'ont manifesté aucune hypertrophie, et pendant tout le temps de l'expérience (63 jours), il n'a été observé aucun accident secondaire.

Un second *Macacus cynomolgus*, inoculé à l'arcade sourcilière gauche et à la verge avec du virus d'un chancre induré d'homme, a présenté, 28 jours après, quatre petites taches rouges non confluentes au-dessus de l'œil gauche. Le lendemain ces lésions se sont accentuées et ont laissé apercevoir une petite squame centrale; mais, 8 jours après, la guérison a été presque complète. La verge et les ganglions lymphatiques se sont montrés indemnes de toute lésion. Dans ce cas, il n'a pas été non plus observé d'accidents secondaires.

Un troisième *M. cynomolgus*, ainsi que trois *M. sinicus* et un maimon (*M. nemestrinus*), inoculés par scarification avec du virus syphilitique, se sont montrés absolument réfractaires. De même, un *M. sinicus*, inoculé sous la peau de la cuisse avec du virus de chancre induré, et deux *M. cynomolgus*, inoculés au même endroit avec du sang de deux personnes syphilitiques, sang pris au moment de l'éruption roséolique, n'ont présenté aucun symptôme morbide, sauf une légère adénopathie chez un *M. cynomolgus*.

Somme toute, sur 12 expériences faites sur des maca-

ques, 4 seulement ont donné quelques lésions insignifiantes. Le peu d'importance des lésions syphilitiques, leur courte durée, et l'absence d'accidents secondaires ont fait supposer que les macaques sont capables d'atténuer le virus de la syphilis. Pour résoudre cette question, il a fallu reporter ce virus, après son passage par l'organisme du macaque, sur un être sensible à la syphilis. Comme tel. nous avons pris le chimpanzé. dont la réceptivité est déjà suffisamment démontrée.

Aussitôt après l'apparition de l'accident primaire à l'arcade sourcilière du premier *M. sinicus* mentionné dans ce mémoire, nous avons prélevé un peu de sérosité, nous l'avons inoculée au clitoris et au prépuce clitoridien d'un jeune chimpanzé femelle, qui nous avait été envoyé directement du Congo français. L'inoculation a été pratiquée avec le scarificateur *Vidal*, et n'a provoqué que des érosions tout à fait superficielles, qui guérirent les jours suivants sans laisser de traces.

Après une période pendant laquelle les parties inoculées ne présentaient rien d'anormal, le 15e jour après l'introduction du virus, le prépuce clitoridien est devenu hypérémié, avec quelques taches plus rouges que l'entourage. Du côté gauche du prépuce il s'est développé, au milieu d'une petite tache rouge, une toute petite squame. Du côté droit nous avons trouvé une autre tache rouge, comme une tache de roséole, montrant dans sa partie centrale une érosion superficielle de la grosseur d'une tête d'épingle. Ces lésions ont présenté une ressemblance frappante avec les taches rondes de la lèvre supérieure du *M. sinicus* que nous avons décrites plus haut.

Déjà, le lendemain, la rougeur du prépuce a beaucoup diminué et les squames centrales sont devenues très sèches, de couleur brun foncé. Le jour suivant, à côté des deux premières lésions en voie de guérison, nous avons remarqué trois autres points rouges, encore plus petits que les premiers.

Cinq jours après la première manifestation syphilitique, les lésions du côté gauche du prépuce clitoridien étaient complètement guéries. La plus grande lésion était aussi en voie de pleine guérison. On n'apercevait qu'une petite squame sèche au milieu de la muqueuse normale. Les jours suivants la guérison a été complète, de sorte que l'accident primaire n'a duré qu'une dizaine de jours.

Il est à remarquer que les petites lésions, provoquées par le virus du macaque, n'ont donné lieu à aucune induration du tissu.

Après la guérison définitive des lésions que nous venons de décrire, soit 30 jours après la première inoculation, nous avons soumis notre chimpanzé à une nouvelle expérience. Nous lui avons inoculé par scarification, au prépuce clitoridien, du liquide clair, recueilli sur un chancre syphilitique. Le malade fournisseur du virus était atteint depuis huit jours de chancre induré de la verge, et présentait des paquets ganglionnaires indolores aux deux aines. Les ganglions du côté gauche, correspondant au chancre, étaient plus volumineux que ceux du côté opposé. Le malade n'avait subi aucun traitement ni local ni général.

Ne voulant pas soumettre à cette inoculation d'épreuve uniquement le prépuce clitoridien, siège de l'accident provoqué par le virus du macaque, nous avons introduit du liquide, prélevé sur le même malade, à la cuisse gauche du chimpanzé. Nous avons choisi cet endroit, car il s'est montré sensible chez le second chimpanzé décrit dans notre premier mémoire. L'inoculation a été faite après scarification superficielle de la peau.

Les lésions insignifiantes provoquées par le scarificateur guérirent au bout de peu de temps et ne furent suivies d'aucune manifestation syphilitique locale. Mais environ 8 jours après l'inoculation du virus humain, le chimpanzé a manifesté une adénopathie généralisée. Aux deux aines les ganglions — indolores — étaient faciles à percevoir; aux aisselles ils étaient moins marqués. En outre on pouvait distinguer le ganglion cervical postérieur, sous forme d'un corps rond, de la grosseur d'un petit pois et entièrement mobile.

Depuis 93 jours écoulés après l'inoculation de virus de macaque, notre chimpanzé ne présente aucun accident secondaire ni à la peau ni aux muqueuses. Depuis 63 jours écoulés après l'introduction du virus humain, l'animal n'a manifesté aucun accident attribuable à cette inoculation. On est donc en droit de conclure que la première inoculation avec du virus de macaque a donné au chimpanzé une immunité vis-à-vis du virus syphilitique. Il est impossible d'attribuer l'absence d'accidents syphilitiques chez notre anthropoïde à une immunité naturelle, car la première inoculation a été suivie de lésions, légères,

il est vrai, mais pourtant bien caractéristiques. D'un autre côté, il n'est pas possible non plus de croire à l'innocuité du virus humain inoculé au chimpanzé à titre d'épreuve. Le même virus a été en même temps inoculé à un *M. cynomolgus* neuf, qui devait servir de témoin, et aussi au *M. sinicus* qui a déjà eu un accident primaire à l'arcade sourcilière gauche et à la lèvre supérieure. Le macaque témoin a présenté, 27 jours après l'inoculation, une lésion primaire à l'arcade sourcilière, lésion que nous avons déjà décrite plus haut. Par contre le *M. sinicus* n'a manifesté aucun symptôme, ce qui prouve que la première inoculation de la syphilis, suivie d'accident primaire, a conféré l'immunité vis-à-vis de la nouvelle inoculation du virus.

Nos expériences, quoique encore peu nombreuses, suffisent déjà à démontrer la possibilité d'obtenir une atténuation du virus syphilitique par passage à travers le macaque, et de produire une immunité artificielle à l'aide du virus atténué.

Ces données doivent être encore confirmées plusieurs fois, et leur étude doit encore être approfondie, avant que l'on puisse songer à en faire une application.

Comme le virus du macaque, quoique atténué, a cependant produit de l'adénopathie généralisée chez notre chimpanzé, il serait utile de rechercher un virus encore plus faible. Peut-être le *M. cynomolgus*. plus résistant que *M. sinicus*, sera-t-il capable de le procurer. La famille des singes fournira sans doute, toute une gamme de virulences variées de virus syphilitique, car elle renferme des espèces de réceptivités différentes, depuis les anthropoïdes, dont la sensibilité se rapproche de celle des races humaines inférieures, jusqu'aux mandrills et aux maimons qui accusent une résistance naturelle complète.

D'un autre côté, il y a lieu de chercher des vaccins non vivants, obtenus avec du virus syphilitique soumis à l'influence des agents physiques et chimiques variés. Ces recherches demandent beaucoup de temps et de précautions : elles sont en voie d'exécution, mais sont encore loin de donner des résultats définitifs.

LES TEIGNES CRYPTOGAMIQUES ET LES RAYONS X.

PAR R. SABOURAUD

AVEC LA COLLABORATION TECHNIQUE DE H. NOIRE.

I

COMMENT SE POSE LE PROBLÈME DU TRAITEMENT DES TEIGNES CRYPTOGAMIQUES

Il y a quelques années, le problème de la guérison des teignes cryptogamiques se posait ainsi : Tous les antiseptiques *in vitro* tuent tous les cryptogames parasites des cheveux, mais aucun antiseptique ne pénètre dans le follicule pilaire à plus de 1 millimètre de profondeur. Or, le cheveu de l'enfant a 4 millimètres d'implantation dans la peau, et les parasites des teignes habitent sa racine jusqu'à son renflement terminal ou bulbe.

A côté des teignes tondantes, il y a bien la teigne faveuse, dans laquelle le parasite placé de même est pareillement inaccessible à l'antisepsie, et pourtant, dans cette maladie, l'épilation répétée du cheveu parvient à réaliser une stérilisation discontinue de sa partie radiculaire. On guérit cette maladie par cinq ou six épilations répétées à un mois d'intervalle.

Mais ce procédé, utilisable dans la teigne faveuse *parce que le cheveu* favique *reste solide*, est impraticable dans la teigne tondante, *parce que le cheveu malade est devenu cassant.* On ne l'épile pas entier. Il casse en son point le plus malade. Sa racine garde des spores à foison. Le cheveu continue à pousser, mais le parasite continue à s'y développer au fur et à mesure de sa formation.

Ce n'est pas le lieu de s'étendre sur toutes les preuves qu'on peut donner de l'impénétrabilité du follicule pilaire de l'homme aux antiseptiques; déjà, il y a sept ans, je pouvais écrire :

« Non seulement aucun traitement connu n'est curateur des teignes tondantes, mais je me crois même autorisé à prévoir qu'aucun traitement antiseptique quelconque ne parviendra dans l'avenir au but cherché. Car si l'on peut varier la nature chimique des antiseptiques, cela change à peine leur pouvoir physique de pénétration. Ils seront solides, liquides ou gazeux, et se heurteront toujours au même obstacle mécanique, qu'aucun des agents employés, quelle que soit sa nature, n'a pu franchir à

bien loin près : *La racine du cheveu est inaccessible aux antiseptiques externes*[1]. »

Dès lors, la solution du problème ne pouvait être fournie que par un agent capable de suspendre quelque temps la fonction de la papille qui crée le cheveu.

C'est dans ce but que j'étudiai pendant deux ans une toxine microbienne capable de déterminer autour de son point d'inoculation une aire alopécique passagère, et de faire tomber, entier, spontanément, le poil des teignes qu'on ne peut épiler, parce qu'il est fragile.

Cette toxine ne put être utilisée sur l'homme, parce que les aires de dépilation qu'elle provoque se produisent n'importe où dans la fourrure de l'animal, et non pas au point d'inoculation.

Toujours dans la même direction d'idées, j'essayai le pouvoir dépilant bien connu de l'acétate de thallium. Dix-neuf jours après l'application pendant 6 heures, sur les plaques de teigne, d'une pommade contenant de l'acétate de thallium au 1/3, les cheveux sains et malades de toute la tête tombaient spontanément; j'eus ainsi cinq enfants guéris de teigne tondante en deux mois; les cheveux repoussant tous sains, six à sept semaines après leur chute.

Mais l'intoxication possible se traduisant par de l'albumine, de la gingivite avec sialorrhée, et même des hémorragies sous-cutanées, rendait le remède pire que le mal.

Ces essais furent abandonnés comme les premiers ; c'est la radiothérapie qui devait fournir la solution du problème

II

PREMIERS ESSAIS DE RADIOTHÉRAPIE DES TEIGNES

Il est, je crois, impossible de dire quelle part d'invention revient à chacun des auteurs qui ont documenté la question.

En 1896, un an après la découverte de Röntgen, Freund essayait déjà le traitement radiothérapique des teignes comme celui de toutes les dermatoses, indistinctement. En 1900, Schiff affirmait déjà au Congrès de Paris que la radiothérapie était sans conteste le traitement d'avenir de la teigne tondante et

1. Sabouraud, Étude clinique et expérimentale sur les origines de la pelade. *Annales de Dermatologie*, 1896, p. 1 et 2 du tirage à part.

du favus. Depuis lors, en Angleterre, en Amérique, en Allemagne, nombre d'essais partiels furent tentés.

A Paris, je citerai en première ligne les essais de MM. Oudin et Barthélémy, puis ceux de Gastou, Vieira et Nicoulau, ceux de Brocq, Bisserié et Belot.

Pour les résumer brièvement, on peut dire que tous les auteurs qui ont appliqué les rayons X au traitement des teignes ont eu des cas de guérison partielle ou totale par dépilation.

Mais l'absence d'instruments de mesure des radiations employées, et les accidents qui en ont été la conséquence, ont rendu les premiers expérimentateurs fort timorés, et de même beaucoup de ceux qui les ont suivis. De là, pour la plupart, un nombre interminable de séances d'application (on a dit 40 pour un seul cas), et cela seul rendait la radiothérapie des teignes sans valeur pratique.

Schiff le premier avait osé des séances d'une 1/2 heure. Bisserié et Belot, lorsqu'ils voulurent bien mettre à notre disposition, avec une entière obligeance, leur expérience acquise et leur documentation, croyaient des séances de 25 minutes nécessaires et suffisantes pour produire la dépilation et, par suite, la guérison d'une plaque de teigne.

En résumé, il restait et reste encore nécessaire qu'on fixe de plus en plus précisément les règles expérimentales du traitement radiliothérapique des teignes. Et nous l'avons pu mieux que d'autres, à cause du grand nombre d'enfants teigneux confiés à nos soins.

En dehors du concours des hommes de pratique, les hommes d'étude, savants et techniciens, ont apporté au sujet une contribution bien plus importante encore et bien plus générale. Nous allons voir les améliorations que Kienbök, Holzknecht, Beclère, Destot, Williams, Villars, Drault, Muller, etc., apportèrent à l'appareil premier de Röntgen, et les perfectionnements dont ils dotèrent l'œuvre commune. Une telle œuvre à sa naissance est améliorée par toutes mains, même anonymes.

III

DISPOSITION DE L'APPAREIL

Les accidents qui ont signalé les premières applications thérapeutiques des rayons X ne sont presque plus possibles

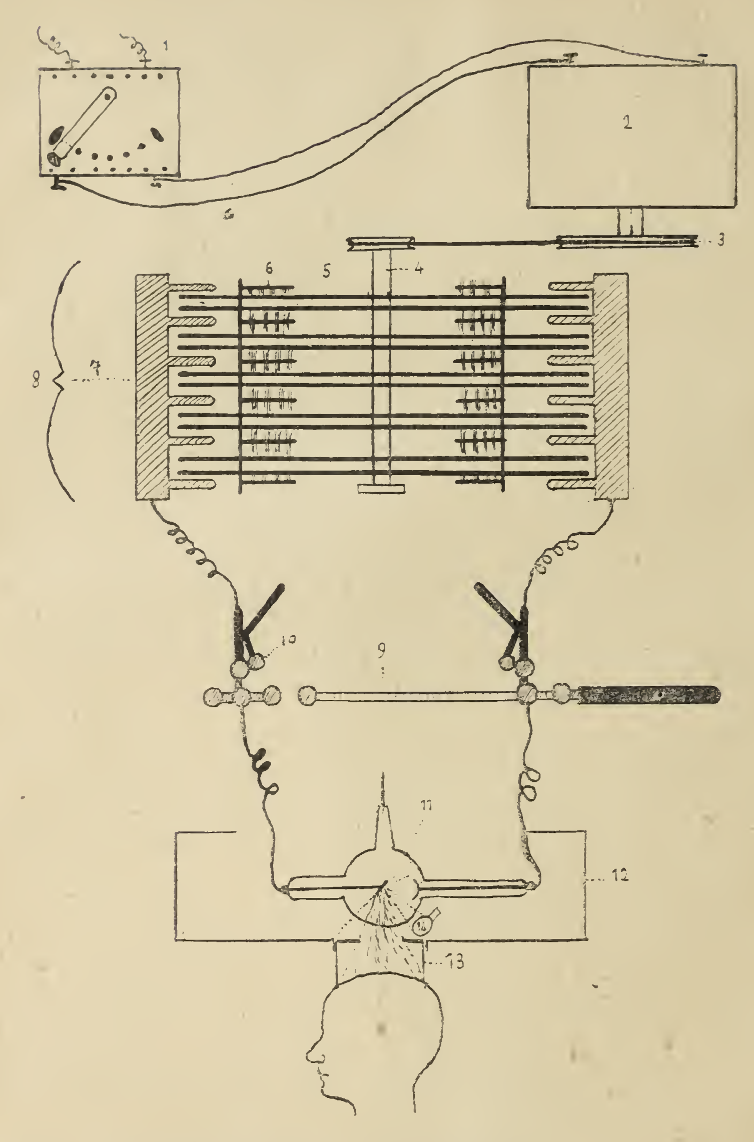


Fig. 1. — *Géométral de l'appareil radiothérapique.*

1. — Rhéostat placé au niveau de la prise du courant sur le secteur de la ville.

2. — Dynamo correspondant à 3/4 de cheval-vapeur.

3. — Sa poulie de transmission.

4. — Arbre de couche de la machine statique.

5. — Un des dix plateaux de la machine statique.

6. — Balais.

7. — Collecteur.
8. — Ensemble de la machine statique à 10 plateaux.
9. — Spintermètre de Béclère disposé en court-circuit.
10. — Excitateur à boule de Destot pour augmenter la résistance de l'ampoule.
11. — Ampoule de Crookes-Villars.
12. — Chape métallique enfermant l'ampoule.
13. — Cylindre métallique porte-diaphragme, mobile.
(Le dessin ne peut montrer la disposition du radiochromomètre de Benoist, placé en 14 et dont on voit mieux la disposition dans la fig. 3.)

aujourd'hui, grâce à l'emploi des nombreux dispositifs d'invention récente qui permettent de surveiller et de contrôler le fonctionnement de l'appareil pendant sa marche.

Mais étant donnés ces accidents, il est nécessaire d'indiquer le Manuel opératoire qui permet de les éviter. En tous sujets scientifiques, d'ailleurs, les techniques doivent être décrites avec précision.

Voici (fig. 1) un géométral qui schématise fort exactement l'appareil construit par M. Drault, et dont M. Noiré et moi nous sommes servis pour le traitement des teignes.

1. — La force électrique nécessaire pour actionner tout le système est minime, elle correspond à une lampe ordinaire de 10 bougies. La prise de courant sur un secteur électrique est donc banale.

2. — Ce courant actionne une dynamo de 3/4 de cheval-vapeur (2).

3. — Entre la prise du courant et la dynamo est un rhéostat pour limiter le débit électrique ou éviter les à-coups, s'il venait à s'en produire. On y ajouterait un commutateur, si le courant sur lequel on se branche était alternatif.

4. — La dynamo (2) actionne par une courroie un arbre de couche (4) qui transmet son mouvement aux 10 plateaux (5) de la machine statique (8) dont on voit les balais en 6 et les collecteurs en 7.

5. — De ces collecteurs partent deux fils (±) se rendant aux 2 pôles de l'ampoule de Crookes modifiée par Villars (11).

6. — Sur le trajet de ce grand circuit est interposé en court-circuit un excitateur à boule (9) dont la tige mobile est graduée. C'est le *spintermètre de Béclère,* invention admirable d'utilité et de simplicité. Qu'on en juge.

Si, la machine en marche, les 2 boules du spintermètre étant éloignées de 2 centimètres, l'ampoule de Crookes-Villars

reste allumée, c'est que sa résistance n'équivaut pas à celle des 2 centimètres d'air qui séparent les 2 boules du spintermètre, car si la résistance de l'ampoule augmentait, une étincelle établirait un court circuit entre les deux boules du spintermètre et l'ampoule s'éteindrait.

L'interposition du spintermètre annonce donc à chaque instant que le degré de résistance de l'ampoule ne dépasse pas celui qu'on veut, et que l'expérience a montré utile pour le résultat que l'on cherche.

7. — L'ampoule de Crookes-Villars (fig. 2) est plus résistante à proportion du travail qu'elle a déjà fourni. Dans la langue spéciale au sujet, on dit qu'elle devient *dure*. Elle devient dure parce que son travail raréfie de plus en plus les gaz qu'elle con-

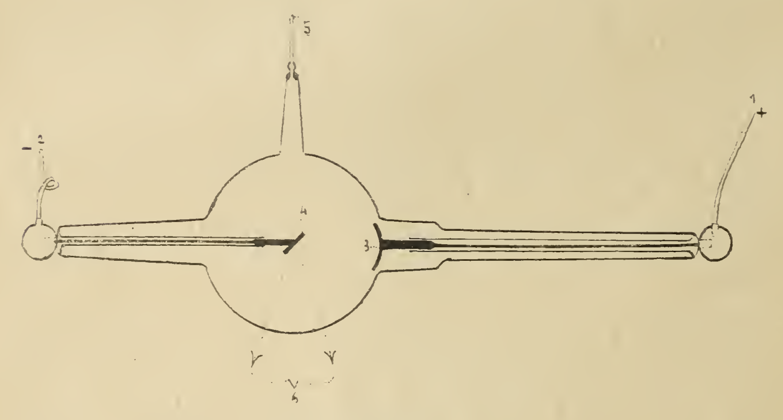


Fig. 2. — *Ampoule de Crookes-Villars.*

1. — Electrode positive.
2. — Électrode négative.
3. — Cathode.
4. — Anti-cathode.
5. — Osmo-régulateur de Villars (tube de platine qui, porte au rouge, laisse passer dans l'ampoule l'hydrogène d'un bec Bunsen et diminue la résistance de l'ampoule).
6. — Faisceau utilisé des rayons cathodiques.

tient encore, bien qu'on les ait fortement raréfiés en la construisant.

Or une ampoule dure donne des rayons de plus en plus pénétrants. Il faut donc, quand la crépitation de l'étincelle du spintermètre avertit qu'elle devient trop dure, la rendre molle à volonté.

8. — *L'Osmo-régulateur de Villars.* Pour celà Villars a modifié l'ampoule de Crookes par un dispositif des plus ingénieux. Sur une effilure latérale de l'ampoule il a soudé le bout ouvert d'un tube de platine fermé par son autre extrémité, à la façon d'une bougie filtrante.

Quand la résistance de l'ampoule augmente, on chauffe avec un brûleur Bunsen ce cæcum de platine. Il rougit, devient poreux et laisse rentrer dans l'ampoule un peu de l'hydrogène libre de la flamme.

9. — Mais on pourrait rendre ainsi l'ampoule de Crookes beaucoup trop molle et le spintermètre n'en laisserait rien savoir. Or cela est grave, car l'ampoule molle fait des rayons peu pénétrants, excessivement nocifs pour la surface de l'épiderme; c'est ici qu'intervient un autre appareil de mesure : le *radio-chromomètre de Benoist.* Cet appareil a la forme d'un escalier tournant dont les marches sont taillées dans un bloc d'aluminium et dont le giron est occupé par une mince lame d'argent transversale. On conçoit que des rayons X qui traversent quatre marches d'aluminium sont plus pénétrants que ceux qui traversent deux marches ou une seule,

On place cet appareil sur le trajet des rayons X, émis par l'ampoule. Ces rayons produisent un éclairement constant de la lame d'argent, et éclairent d'une façon équivalente, l'une des marches, l'un des secteurs d'aluminium. Supposons que c'est maintenant la marche n° 4 de l'escalier, si l'ampoule mollit, l'éclairement du secteur 4 baisse et c'est le secteur 3 dont l'éclairement devient semblable à celui du centre d'argent de l'appareil. Ainsi donc le radio-chromomètre de Benoist avertit que l'ampoule mollit comme le spintermètre avertit qu'elle devient dure.

10. — Nous savons comment on rend l'ampoule plus molle en chauffant son cæcum de platine, mais comment la durcir?

Détonateurs de Destot et Williams. On fait agir pour cela un tout petit excitateur à boule annexé le long du courant positif, sur le spintermètre lui-même (10 fig. 1). En écartant légèrement sa manette de sa position de repos, on crée une étincelle continue, une dérivation latérale du courant, une résistance. Et l'ampoule durcit, ce dont le radio-chromomètre rend compte aussitôt.

Ainsi donc, parmi ces dispositifs secondaires, deux sont des appareils de mesure ; le spintermètre avertit quand la résistance

de l'ampoule augmente, le radio-chromomètre avertit aussi quand elle baisse.

Et on remédie instantanément à ces deux inconvénients, en chauffant le cæcum de l'ampoule pour diminuer sa résistance, ou en écartant l'excitateur latéral au fil positif pour l'augmenter

Ainsi nous savons à tout instant quel est le degré de pénétration des rayons X que produit notre ampoule, et si ce degré change, nous en sommes avertis et nous pouvons ramener ces rayons à ce que nous considérons comme utile au but cherché.

11. — Une seule mesure nous manque maintenant. C'est celle de la *quantité* de rayons X que produit notre machine dans un temps donné. Nous savons à chaque instant leur valeur, leur pénétration, non pas leur nombre.

Pour mesurer cette inconnue, on se sert des *pastilles de Holzknecht*. Elles sont faites d'un mélange de sels alcalins dont les rayons X font lentement virer la coloration. On en place une sur le trajet des rayons émis par l'ampoule, et à la même distance que la peau du malade. Et de temps en temps on examine le degré de virage qu'a subi sa couleur par rapport à une échelle fixe de 12°, chacun de ces degrés appelé conventionnellement par Holzknecht *une unité H*.

Or on sait par expérience que le virage correspondant sur l'échelle à la 5e couleur (5 unités H) est un maximum à ne dépasser qu'à bon escient, au moins en une seule séance[1].

... Si l'on a suivi tout ce qui précède, on comprendra exactement ce que je veux dire par la formule thérapeutique suivante, que 100 cas traités jusqu'à ce jour nous ont permis d'établir.

Pour guérir une plaque de teigne, il faut l'exposer a une distance de 15 centimètres du centre de l'ampoule de Villars, l'ampoule ayant une résistance constante correspondant à la quatrième division du radio-chromomètre de Benoist, jusqu'à ce que la source électrique ait fourni une somme de rayons X correspondant à 4 et demi ou 5 unités H de Holzknecht.

1. Le temps nécessaire à chaque séance est à déterminer pour chaque machine et chaque ampoule dont on se sert. Ce qu'il faut obtenir, c'est, en une séance, une quantité de rayons X équivalant à 4 1/2 unités H de Holzknecht. Telle ampoule donnera cette quantité de rayons X en 20 minutes, telle autre en 60 minutes, etc... Le temps de pose ne peut donc pas être indiqué d'une façon générale. Chaque ampoule dont on se sert est à jauger avant qu'on s'en serve. Sa puissance diminue avec son usure progressive, après soixante heures de travail ordinairement.

En agissant ainsi on obtiendra exactement ce qu'on désire. c'est-à-dire la dépilation pure et simple de la région insolée, sans plus, sans complication de brûlures bénignes ou graves d'aucune sorte, en un mot sans accidents[1].

A lire tout ce qui précède, on pourrait croire qu'un appareil aussi complexe est extrêmement difficile à conduire. Pratiquement, c'est le contraire qui est vrai. Toute cette série d'instruments est si docile, si en main, que l'ensemble en est aussi simple à diriger qu'un autoclave. Sous nos yeux, une infirmière une fois dressée y suffit. Il ne lui est pas arrivé, pas plus qu'à nous, de causer le moindre accident.

IV

DISPOSITIFS ANNEXES

Je veux insister encore sur un dernier dispositif nécessaire pour parer aux inconvénients de la diffusion des rayons X.

On sait que toute une hémisphère de l'ampoule émet des rayons actifs. L'opérateur n'est donc à peu près à l'abri de leur action que quand il est placé de l'autre côté de l'ampoule. Il ne verrait ainsi ni son patient, ni son radio-chromomètre.

Or, cet instrument étant ce qu'est le manomètre d'une chaudière ne doit jamais être perdu de vue. Il faut donc entourer l'ampoule d'un manchon de tôle, c'est *la chape* (12 fig. 1 et fig. 3). Elle est percée de trois orifices. De l'un part un tube gradué de longue-vue disposé pour recevoir la pastille de Holzknecht; l'autre est fermé par le radio-chromomètre de Benoist. Sur le troisième, beaucoup plus grand, peut s'adapter toute une série de manchons métalliques d'une longueur calculée pour que leur extrémité périphérique où le patient vient coller sa tête se trouve à $0^m,15$ du centre de l'ampoule. Ces manchons varient de diamètre, cela va sans dire, avec la surface qu'on veut traiter.

1. Il est bien entendu que ce résumé succinct simplifie le plus possible le détail du fonctionnement des appareils annexes nommés, et passe sous silence la théorie sur laquelle ils sont basés.

Ainsi toute émission latérale, toute diffusion des rayons X est prévenue. Aucun ne peut atteindre l'opérateur, ni le patient,



FIG. 3. — Dispositif pratique d'application de la méthode.

sauf sur la région malade. J'ajoute que chaque manchon de grand diamètre présente un diaphragme métallique (fig. 1), qui élimine tous les rayons parasites, tous ceux qui ne sont pas des rayons directs, tous ceux enfin qui ne sont pas compris dans un angle d'ouverture de 50°. Car ce cône de rayons partant de l'ampoule

comprend les seuls qui ne nuisent pas à l'épiderme et les seuls qui soient utiles.

Tous ces appareils accessoires de l'ampoule et sa chape métallique portant son manchon, son radio-chromomètre, etc., sont disposés horizontalement et mobiles en tous sens autour d'une tige verticale fixe. Des articulations et des crémaillères permettent de disposer l'ampoule à toute hauteur et le faisceau utile des rayons X dans toute direction (fig. 3).

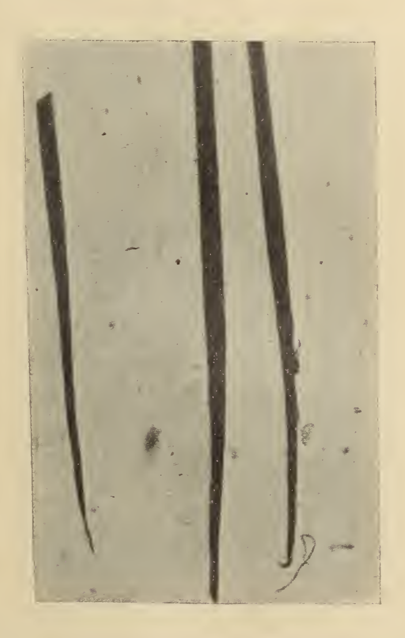


Fig. 4. — *Cheveux sains tombés 20 jours après une séance de radiothérapie du cuir chevelu.* Remarquer l'effilure progressive de leur segment inférieur. (45 diamètres.)

V

SUITES OPÉRATOIRES NORMALES. — DÉPILATION. — ÉLIMINATION DES CHEVEUX MALADES. — REPOUSSE

Un cuir chevelu dont une région a été traitée suivant la formule donnée plus haut ne montre rien d'immédiat. Vers le 7e jour se produit sur la région insolée un érythème à peine perceptible,

qui disparaît quatre jours plus tard, et est remplacé par une pigmentation si faible qu'il faut la rechercher pour la voir. A partir du quinzième jour, sur toute l'aire du cercle insolé, les cheveux tombent sans aucun effort de traction. En quelques jours,

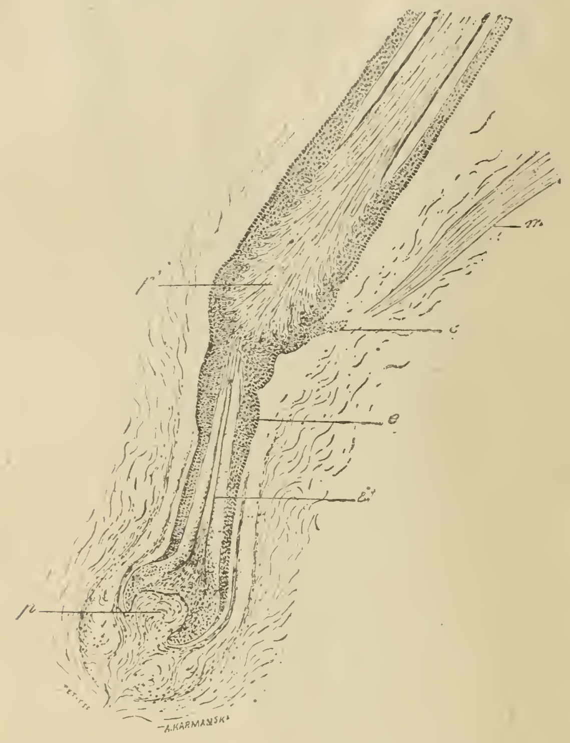


Fig. 5. — *Renaissance du cheveu nouveau au-dessous du cheveu mort en voie d'expulsion* (d'après Ranvier).
p, papille du nouveau poil.
i, sa gaine épithéliale interne.
e, sa gaine épithéliale externe.
pr, bourgeon épithélial au niveau du muscle redresseur du poil *m*.

la dépilation est complète. Nous avons l'habitude de l'activer par des savonnages quotidiens suivis d'une friction douce avec une liqueur faiblement iodée pour assurer l'antisepsie de surface.

Le *mécanisme de la chute du cheveu* est établi. La papille pilaire est d'une extrême sensibilité; nombre de causes connues ou inconnues suspendent sa fonction créatrice du cheveu. Et toute suspension totale de sa fonction implique la mort et la chute du cheveu. Ainsi est-il fréquent de voir tomber autour d'un

furoncle, par exemple, une couronne de cheveux, qui d'ailleurs repousseront. On dit que les papilles ont subi une *sidération* momentanée. Il est certain que les rayons X produisent une semblable sidération des papilles qu'ils ont touchées. Elles cessent progressivement leur fonction. Les cheveux qu'elles créaient enregistrent cette mort lente, par un effilement progressif de leur partie radiculaire.



FIG. 6. — *Restes de cheveux teigneux* (teigne tondante à petites spores) *expulsés vingt jours après une séance de radiothérapie du cuir chevelu.* Remarquer leur gaine parasitaire encore existante (60 diamètres.)

Quand la papille cesse tout travail, le cheveu cesse d'être (fig. 4). Ce n'est plus qu'un corps étranger; le doigt de gant épidermique qui le contient l'élimine alors peu à peu, en s'effaçant au-dessous de lui. Après un temps, un bourgeon épithélial massué se reforme obliquement à la place du follicule atrophié. Son renflement devient une nouvelle papille sécrétant un nouveau cheveu (fig. 5).

Mais lors même que la repousse du cheveu nouveau suit de très près l'expulsion du cheveu mort, l'un reste, séparé de l'autre, ordinairement, par une épaisseur d'épiderme complet,

interposé. Ainsi peut-il se faire qu'un parasite spécialisé à l'épiderme *corné*, habitant un cheveu mort en expulsion, soit rejeté hors de la peau par un processus physiologique d'élimination, sans que le cheveu nouveau qui pousse au-dessous du cheveu mort soit contaminé. Les cheveux teigneux sont éliminés comme les cheveux sains, par atrophie momentanée totale de leur papille. Eux aussi s'effilent peu à peu, se séparent de leur papille et sont expulsés (fig. 6).



Fig. 7. — Traitement radiothérapique des teignes. Période de déglabration complète 25 jours après l'application de rayons X.

Il ne faudrait pas croire du reste que les rayons X agissent comme parasiticides. Ils ne tuent pas le trichophyton, du moins dans les conditions expérimentales précisées plus haut. Les dernières parcelles de cheveux malades qu'on recueille à la surface de la peau au moment de leur expulsion sont encore infiltrées de parasite vivant. Les cultures pratiquées avec ces débris sont invariablement positives.

On comprend dès lors, au cours de ce traitement, la facilité des réinoculations sur des aires non traitées de la même tête. Quand les cheveux teigneux tombent, ils sont d'admirables porte-graines (fig. 7). Ce fait explique la nécessité d'une antisepsie constante du cuir chevelu depuis l'opération jusqu'à la

période de déglabration constituée. Nous la réalisons par une friction quotidienne de tout le cuir chevelu avec une teinture d'iode étendue de 5 fois son volume d'alcool.

La repousse des cheveux est lente. C'est un inconvénient de la méthode, mais c'est aussi l'une des raisons de son succès. Le dernier débris de cheveu malade est expulsé depuis longtemps quand les cheveux nouveaux apparaissent. Cette repousse devient visible ordinairement au cours de la 7e semaine après la dépilation, au cours de la 10e semaine après l'opération. Sa date est un peu variable. Nous ne l'avons jamais vue manquer, mais nous l'avons vue tarder de 12 semaines. Elle est toujours lente; dans les cas normaux, elle est à peu près complète deux mois après qu'elle a commencé.

VI

FAUTES OPÉRATOIRES ET ACCIDENTS

Une série de causes peuvent amener des mécomptes dans l'application de cette méthode; les remarques suivantes en diminueront le nombre.

1° La plupart des échecs d'autrefois procédaient de l'*insuffisance du temps de pose.* Tant que nous avons fait des séances de 25 minutes ou moins, nous avions 60 et 80 0/0 de dépilations incomplètes ; à 30 minutes, 40 0/0 d'insuccès encore. *En somme, le temps de pose ne peut pas être indiqué : c'est celui qu'il faut avec une ampoule donnée, pour qu'elle fournisse une quantité des rayons X égale à 4, 5 unités H de Holtzknecht.*

2° *La distance* de 15 centimètres entre le centre de l'ampoule et la tête du patient est une moyenne. Elle pourrait utilement être moindre, mais les rayons obliques étant nuisibles, plus on se rapproche du foyer lumineux, moindre sera le diamètre de l'aire insolée utilement.

3° Les rayons obliques sont plus nocifs pour l'épiderme et moins dépilants. La tête humaine, surtout la tête petite des enfants, présente une convexité de forte courbure. Quand on l'engage dans un manchon de grand diamètre, les rayons obliques qui viennent frapper le cuir chevelu au bord du cylindre sont presque tangentiels à la peau. Ils provoquent le développement d'une folliculite staphylococcique, sans doute par trau-

matisme de l'épiderme, toujours infecté, du cuir chevelu. On voit alors l'aire alopécique, 20 jours après l'opération, sertie d'une couronne de pustules folliculaires épidermiques, complication bénigne, mais ennuyeuse et évitable.

Pour l'éviter, nous ne nous servons que de manchons ayant 9 centimètres de diamètre au maximum. Enfin, pour éviter toute pullulation de cocci, nous avons pris l'habitude de faire, du 10e au 30e jour après l'opération, des applications locales quotidiennes de fleur de soufre, qui est le meilleur topique contre les pustulations folliculaires [1].

4° Il faut employer, pour provoquer la dépilation, des rayons X d'une pénétration moyenne ; moins pénétrants, ils pourraient être nuisibles à l'épiderme. C'est en employant ceux-ci sans doute que sont survenues les radiodermites et les eschares signalées par tous les auteurs, et dont nous n'avons jamais provoqué l'apparition. Peut-être pourra-t-on dans la suite utiliser les rayons qui marquent 3° ou 2° au radiochromomètre, mais ces essais devront être faits avec une extrême prudence.

5° Il semble qu'une machine qui s'alimente à la même source et marche à la même allure doive fournir le même débit de rayons X. Cela n'est pas. Certains jours le courant subit des déperditions, du fait de la tension électrique de l'atmosphère ou de l'état hygrométrique, provoquant des courts circuits aériens, etc... Enfin une ampoule à mesure qu'elle vieillit et qu'elle s'use, fournie une somme moindre de rayons X dans le temps.

Il faudrait, pour s'en apercevoir, user d'une pastille de Holtzknecht pour chaque séance. On s'apercevrait après 30 ou 40 minutes qu'on n'a produit que 3 unités ou 4 au lieu de 4 1/2, et l'on prolongerait ce jour-là les séances de 10 minutes.

Malheureusement, ces réactifs sont dispendieux, on ne s'en sert pas toujours, cela cause quelques insuccès partiels, un certain nombre de dépilations incomplètes...

D'ailleurs, il semble que les sujets eux-mêmes différent les

1. Appliquer au pinceau tous les jours une couche du liniment suivant, après avoir agité la bouteille :

Soufre précipité.	15	grammes.
Alcool à 90°.	15	—
Eau distillée Q. S. pour faire.	100	—

uns des autres, et que les uns dépilent plus complètement et plus vite que les autres placés dans des conditions identiques. Certains dépilent après une séance de 25 minutes, d'autres très rares dépilent incomplètement après 40 minutes de rayonnement, toutes autres conditions égales.

6° Un accident qui nous a causé plusieurs ennuis est le décentrage de l'ampoule [1]. En modifiant la position de tout l'appareil, comme il faut le faire pour chaque nouveau cas, l'ébranlement communiqué à l'ampoule la désaxe. Le diaphragme devenu excentrique projette son ombre sur la peau. On s'en aperçoit à la dépilation 20 jours plus tard.

7° L'immobilité complète du patient est un problème. Rester immobile 40 minutes est difficile pour un adulte, impossible pour un enfant. Que dire des séances multiples que l'on rapproche le plus possible pour ne pas augmenter le temps de traitement?

8° Plus une tête est couverte de points de teigne ou de plaques de teigne, plus son traitement par les rayons X se trouve compliqué. Les très bons cas sont ceux qui ont été pris à temps et ne montrent qu'une ou deux plaques petites. Dans ce cas, autant de plaques, autant d'applications.

9° Où le problème devient grave, c'est quand les points sont tellement nombreux et disséminés, qu'il faut provoquer la dépilation de la tête entière. On ne peut la pratiquer que par taches de 8 à 9 centimètres de diamètre. Il faut s'y prendre *à douze reprises;* en comptant 2 séances journalières, une le matin, une le soir, c'est une semaine de travail. L'expérience, prudemment menée, nous a montré qu'on pourrait faire 5 opérations de 40 minutes sur 5 surfaces différentes de la même tête, l'une après l'autre, sans aucun intervalle de temps, sans même causer à l'enfant un mal de tête. Mais l'immobilité est impossible à obtenir dans ces cas. et alors le résultat final est mauvais.

10° Une autre difficulté vient de ce qu'on ne peut procéder que par des aires rondes, et que, même en les juxtaposant, il reste entre elles des triangles courbes non insolés qui exigent chacun une opération complémentaire. Nous avons fait construire des tubes de cette forme pour faire dépiler à leur tour ces

1. Un nouveau support d'ampoule avec chariot mobile à crémaillère suivant les 3 directions (Drault) remédiera à cet accident.

écoinçons, mais il faut beaucoup de surveillance pour que ces surfaces traitées l'une après l'autre se juxtaposent exatement.

Ces difficultés de pratique font comprendre la possibilité de quelques retards. Sur les bords d'une plaque dépilée coïncidant mal avec la plaque voisine, il demeure une lisière de cheveux sains parmi lesquels une dizaine de cheveux teigneux suffiront pour créer des récidives locales.

Ou bien, pendant le traitement, on s'est abstenu quelques jours des applications antiseptiques de surface, et les cheveux parasites, morts, caducs, vont semer de nouvelles plaques dans des régions jusque-là saines.

Toutes ces raisons font encore, malgré tout, 5 à 10 0/0 d'échecs relatifs, principalement dus à 3 causes.

α. Une dépilation insuffisante sur 1 ou 2 points et qui laisse quelques cheveux malades sans les faire tomber.

β. Un oubli opératoire réservant un îlot de cheveux malades difficiles à voir, et dont on s'aperçoit quand la guérison du reste est obtenue.

γ. Quelques réinoculations en cours de traitement.

Malgré ces cas particuliers qui viennent encore alourdir les statistiques, voici les résultats thérapeutiques que l'on est en droit d'espérer dorénavant de la méthode de traitement que nous venons de décrire.

VII

CONCLUSIONS

Avant le traitement radiothérapique, la moyenne du temps de traitement de la teigne tondante était à l'hôpital Saint-Louis de 18 mois. Partout ailleurs je n'hésite pas à la déclarer plus longue, à moins que les enfants ne fussent considérés comme guéris sans l'être en réalité, chose ordinaire, presque de règle.

Avec les rayons X, le traitement des teignes cryptogamiques (teigne tondante et teigne faveuse) tombe en ce moment à 3 mois. Ce traitement nouveau raccourcira donc la maladie des 5/6 de sa durée.

Si l'on songe que Paris contient endémiquement environ 4,000 teigneux, que l'Assistance publique de Paris en hospitalise environ 650, que son budget des teigneux hospitalisés ou

soignés en ville est annuellement de 450,000 francs environ, enfin que l'Assistance publique, faute de place et d'argent, ne pouvait parvenir à les soigner tous, on pourra mesurer le progrès que la nouvelle thérapeutique va permettre de réaliser.

Ce progrès n'est l'œuvre exclusive de personne, et notre part contributive à sa naissance fut moindre que celle de beaucoup: l'histoire brève du sujet que nous avons esquissée plus haut suffira, j'espère, à ne point laisser de doute sur ce point. Mais il est inévitable, dans des sujets aussi ardemment creusés, que ce ne soit pas toujours ceux qui sèment qui récoltent [1].

1. Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à M. Mesureur, directeur général de l'Assistance publique, pour avoir bien voulu donner au laboratoire de l'École Lailler, à l'Hôpital Saint-Louis, les fonds d'étude qui ont fourni les résultats que nous venons d'exposer.

Recherches sur la coagulation du sang.

Par les Drs J. BORDET et O. GENGOU

TROISIÈME MÉMOIRE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU PLASMA FLUORÉ

(Travail de l'Institut Pasteur de Bruxelles.)

Parmi les plasmas spontanément incoagulables que l'on peut obtenir, le plasma fluoré est certes l'un des plus intéressants, en raison de ses caractères fort particuliers. Arthus et Pagès ont établi que l'addition, au sang qui sort des vaisseaux, de 3 0/00 environ de fluorure de sodium empêche la coagulation. Jusqu'ici, rien de surprenant : les fluorures solubles précipitent les sels calciques, qui sont indispensables à la production du fibrin-ferment actif. Au premier abord, on serait donc tenté d'assimiler le plasma fluoré au plasma oxalaté, et de réduire le rôle du fluorure, comme celui de l'oxalate, à l'influence insolubilisante exercée sur la chaux.

Mais l'analogie entre le plasma fluoré et le plasma oxalaté ne saurait être acceptée dès qu'on soumet ces liquides à une étude plus approfondie. Arthus et Pagès ont montré en effet que le plasma oxalaté se coagule lorsqu'on lui restitue des sels calciques; au contraire, l'addition au plasma fluoré d'une quantité même forte de sels de chaux solubles ne provoque point sa coagulation : les caractères des deux plasmas ne sont donc nullement concordants; une distinction fort tranchée s'impose. Le pouvoir coagulant des sels de chaux consistant en ce qu'ils permettent la transformation, en fibrin-ferment actif, de la substance mère (proferment), génératrice de ce ferment, on a conclu que le plasma oxalaté contient du proferment, tandis que le plasma fluoré en est dépourvu.

Telle est l'interprétation généralement admise. Mais la con-

clusion ne s'est point bornée là. Certains expérimentateurs ont cherché à expliquer pourquoi le plasma fluoré ne contient pas de proferment; ils ont proposé l'hypothèse suivante : le fluorure sodique est un poison cellulaire; lorsqu'on le mélange au sang qui sort du vaisseau, on tue les cellules et notamment les leucocytes; ceux-ci se trouvent en conséquence dans l'incapacité, soit de sécréter le proferment, soit de le déverser dans le liquide sanguin. D'après cette conception, il faut donc invoquer, pour expliquer le rôle anti-coagulant des fluorures, non seulement l'élimination des sels calciques solubles, mais encore l'altération imprimée aux éléments cellulaires eux-mêmes, dont les manifestations vitales se trouvent suspendues. L'influence qu'exerce le fluorure serait donc, en partie tout au moins, d'ordre biologique [1].

A vrai dire, les expériences que nous allons résumer, et qui concernent le plasma fluoré, ne plaident pas en faveur de cette interprétation. En présence des résultats que nous avons recueillis, nous pensons qu'il n'y a pas lieu de faire intervenir, pour comprendre le rôle du fluorure, l'intoxication des éléments cellulaires. Bien plus, il nous paraît que cette notion primordiale, à savoir que le plasma fluoré ne contiendrait pas de proferment, n'est pas solidement établie; il est fort probable qu'elle est inexacte.

*
* *

Nous avons jugé utile de recourir de préférence, pour faciliter l'étude du plasma fluoré, non pas au sang complet, mais au plasma chloruré sodique de lapin.

Dans notre second mémoire sur la coagulation, récemment publié dans ces *Annales*, nous avons longuement insisté sur la préparation et les propriétés du plasma salé. On l'obtient en recueillant trois parties de sang, au sortir de l'artère, dans une partie de solution de NaCl à 20 0/0; le mélange, salé à 5 0/0, est soumis à une centrifugation prolongée, et l'on décante le plasma limpide surnageant. Ce plasma salé renferme tout ce qui est nécessaire à la coagulation. Il contient notamment du proferment. Seulement, la forte concentration saline s'oppose

1. Quand au fibrinogène, il n'est pas altéré dans le plasma fluoré. Arthus a montré en effet que ce dernier se coagule rapidement quand on l'additionne de fibrin-ferment (sérum).

à la transformation du proferment en ferment actif; cette métamorphose ne s'opère que si l'on abaisse, par addition de 4 volumes d'eau distillée, la teneur en sel jusqu'à 1 0/0 environ. Nous le savons, la production de fibrin-ferment aux dépens de la substance mère exige la présence de sels de chaux, dont le plasma est d'ailleurs suffisamment pourvu; elle est en outre, ainsi que nous l'avons fait voir antérieurement, grandement facilitée par le contact de corps solides mouillables tels que le verre.

Rien de plus simple que d'éprouver le pouvoir anti-coagulant du fluorure sodique en le mélangeant au plasma salé, et de rechercher si ce plasma, ainsi traité, a perdu le pouvoir de se coaguler par addition de la quantité voulue d'eau distillée, même si l'on prend soin de lui restituer, ultérieurement, du chlorure calcique en léger excès. Faisons-le remarquer tout de suite, s'il nous était possible d'obtenir, en partant d'un plasma salé limpide, *privé de cellules*, un plasma fluoré absolument analogue, par tous ses caractères, au plasma classique que l'on prépare en fluorant directement le sang complet au sortir du vaisseau, nous serions en droit d'admettre que la vraie cause du pouvoir anticoagulant du fluorure ne réside pas dans la toxicité qu'il manifeste à l'égard des éléments cellulaires. Bref, nous devons rechercher tout d'abord si le fluorure sodique produit toujours les mêmes effets, soit lorsqu'on le fait agir sur le sang complet qu'on vient d'extraire, soit lorsqu'on l'introduit dans un plasma débarrassé au préalable de ses cellules; si les plasmas fluorés obtenus par ces deux méthodes se montrent complètement identiques, il devient superflu de se préoccuper, pour comprendre le mode d'action du fluorure, des éléments figurés.

Commençons par ajouter à du plasma (salé à 5 0/0), une dose minimes (3 0/00), de fluorure sodique (expérience I). Dans 4 c. c. de plasma salé, introduisons 1 c. c. d'eau distillée renfermant 1,5 0/0 de fluorure. Un quart d'heure plus tard, ajoutons au mélange, pour abaisser suffisamment la concentration saline, 20 c. c. d'eau distillée. La coagulation se produit, mais avec un retard notable. Notons que dans le volume total (plasma salé fluoré + eau distillée), la teneur en fluorure est très peu élevée, car nous avons dilué dans 4 parties d'eau, 1 partie de plasma salé fluoré à 3 0/00.

Donc, le plasma de lapin privé de cellules, fluoré à 3 0/00, puis dilué assez fortement, se coagule. Le sang complet de lapin, fluoré au sortir du vaisseau, se comportera-t-il de même? L'expérience répond par l'affirmative. Si l'on ajoute à 1 volume de sang complet contenant 2 à 3 0/00 (ou même un peu plus) de fluorure, quelques volumes de la solution physiologique de NaCl, la coagulation s'effectue, assez lentement, il est vrai (au bout de quelques heures), mais d'une manière complète[1]. Jusqu'ici, point de différence à signaler entre notre plasma salé fluoré et le sang complet également fluoré.

Avant d'aller plus loin, demandons-nous pourquoi le sang fluoré se coagule lorsqu'on le dilue. L'explication est très vraisemblablement la suivante : le fluorure calcique n'est complètement insoluble dans l'eau qu'en présence d'un excès de fluorure sodique; ce fait se constate aisément : mélangeons des solutions à 2 0/0 de chlorure calcique et de fluorure sodique, en proportions telles que ce dernier réactif se trouve en excès, et centrifugeons. Le précipité de $CaFl^2$ se dépose; décantons le liquide clair surnageant; nous constatons qu'il précipite par $BaCl^2$ (réactif de Fl) mais non par l'oxalate d'ammoniaque; tout le calcium a donc été insolubilisé. Transportons un peu du dépôt de $Ca\,Fl^2$ dans un large tube contenant de la solution physiologique de NaCl (bien exempte de sels calciques), et centrifugeons encore; nous lavons ainsi le précipité en le débarrassant des traces de NaFl; quand il s'est déposé, aspirons le liquide, remplaçons-le par une nouvelle quantité de solution physiologique, et agitons. On constate que cette solution, séparée de $CaFl^2$ par une dernière centrifugation, précipite assez abondamment par l'oxalate d'ammoniaque. Additionnée de NaFl concentré, elle donne quelques flocons légers; le fluorure calcique, soustrait par le lavage à l'action de NaFl, s'est donc partiellement redissous. On peut admettre, en conséquence, que lorsqu'on dilue assez fortement du sang fluoré à 2 ou 3 0/00, et qu'on diminue ainsi la concentration de NaFl, on solubilise une trace de la chaux que le fluorure sodique avait précipitée; cette trace suffit à transformer, lentement il est

1. Il est superflu de dire que ce sang complet fluoré reste indéfiniment liquide lorsqu'on ne le dilue pas.

vrai, le proferment en fibrin-ferment actif, et la coagulation apparaît. Si cette interprétation est exacte, on doit prévoir que du sang fluoré à 3 0/00 ne se coagule pas lorsqu'on le dilue dans de la solution physiologique fluorée elle-même à 3 0/00. C'est ce que l'expérience vérifie.

Si le plasma salé, privé de cellules, se comporte comme du sang complet, il doit rester indéfiniment liquide lorsqu'on y introduit une dose de fluorure supérieure à celle qu'on employait dans l'expérience I, où le plasma salé était bien fluoré à 3 0/00, mais était mélangé ensuite à 4 volumes d'eau distillée pure.

Procédons maintenant de manière à ce que la teneur en fluorure du *volume total* (plasma salé + eau distillée) s'élève à 2 ou à 3 0/00. Versons dans quelques tubes 4 c. c. de solution de NaFl à 3 0/0. Ajoutons à chaque tube des quantités d'eau distillée variant de 25 à 50 c. c., puis introduisons partout 4 c. c. de plasma salé à 5 0/0. Aucun des mélanges ne se coagule (leur teneur en fluorure varie de 2 à 3 0/00 environ). On s'assure bien entendu de ce que le plasma salé se coagule normalement (au bout d'une demi-heure environ) lorsqu'on le dilue dans des volumes semblables d'eau distillée ne renfermant pas de fluorure.

Voici donc un premier point acquis. On peut obtenir, aux dépens de plasma salé privé de cellules, un *plasma dilué fluoré* non coagulable. Mais ce plasma dilué possède-t-il les propriétés du plasma fluoré ordinaire, que M. Arthus obtenait par centrifugation du sang complet fluoré à 3 0/00 ? En d'autres termes, se coagule-t-il par addition de sérum, et d'autre part reste-t-il liquide lorsqu'on y introduit du chlorure calcique en quantité quelconque? Eh bien, l'expérience montre qu'il y a sous ce rapport analogie complète entre le plasma fluoré ordinaire et notre plasma dilué fluoré. Ce dernier se solidifie en quelques instants quand on l'additionne de fibrin-ferment (sérum provenant d'une coagulation normale de plasma salé dilué dans la quantité voulue d'eau distillée). Mais d'autre part le chlorure calcique, quelle qu'en soit la dose, n'en provoque point la coagulation.

En conséquence, nous pouvons conclure, dès à présent, qu'il est inutile d'invoquer l'intoxication des cellules pour expliquer les caractères si particuliers du plasma fluoré, puisque ces pro-

priétés spéciales s'observent tout aussi bien si l'on a soin, avant de fluorer le sang, d'éliminer entièrement les éléments figurés qu'il renfermait. — Une seconde déduction se présente : on n'est pas autorisé à dire, en se fondant sur ce fait que le plasma fluoré ordinaire ne se coagule pas par addition de $CaCl^2$, que ce plasma ne contient pas de proferment. En effet, le plasma salé à 5 0/0 renferme sûrement du proferment (voir notre mémoire antérieur); et cependant, lorsqu'il est dilué et fluoré, il reste liquide en présence du sel calcique.

***

On comprend facilement pourquoi le plasma fluoré ne se coagule pas spontanément; le fluorure est en effet un agent décalcifiant, et la chaux, nous le savons, est nécessaire à la transformation du proferment en fibrin-ferment actif. Mais on conçoit moins aisément la raison de l'incoagulabilité de ce plasma (et notamment de notre plasma dilué fluoré qui incontestablement renferme du proferment) en présence d'un excès de sels calciques solubles. — Pour élucider ce point assez obscur, revenons à notre première expérience. Celle-ci nous a montré que du plasma salé, fluoré à 3 0/00 (4 c. c. de plasma salé à 5 0/0 + 1 c. c. de solution de NaFl à 1,5 0/0) se coagule par dilution dans un volume suffisant (20 c. c.) d'eau distillée. Préparons maintenant un mélange fort semblable, contenant les mêmes proportions de solution fluorée, de plasma salé et d'eau distillée, mais dans lequel la plus grande partie du fluorure a été, avant d'être ajoutée au plasma, neutralisée par du chlorure calcique. Versons dans un tube 1 c. c. de la solution de fluorure à 1,5 0/0, et ajoutons 1 c. c. d'eau distillée contenant à peu près 2 0/0 de chlorure calcique. (On s'est assuré au préalable de ce qu'un mélange à volumes égaux de ces deux solutions, mélange dans lequel apparaît un précipité de $CaFl^2$, contient un léger excès de NaFl, mais ne renferme plus de chaux à l'état soluble, précipitable par les oxalates alcalins.) Ajoutons ensuite le plasma salé (4 c. c.), puis l'eau distillée (20 c.c.). On s'attendrait évidemment à ce que le mélange ainsi constitué se coagulât, plus vite même que la mixture précédente, car il ne diffère de celle-ci qu'en ce que l'agent anticoagulant, le fluorure soluble, a été presque totalement précipité avant d'entrer en contact avec le plasma. Or,

c'est le contraire qui se produit : ce second mélange se maintient indéfiniment liquide.

Ce résultat assez paradoxal s'expliquerait si le précipité de fluorure calcique, abondant dans le second mélange, possédait lui-même un pouvoir anticoagulant énergique. Telle est d'ailleurs la véritable interprétation, ainsi qu'en fait foi l'expérience suivante :

Mélangeons, en parties égales, le fluorure sodique à 1,5 0/0 au chlorure calcique à 2 0/0; accélérons par la centrifugation le dépôt du précipité de $CaFl^2$. Décantons et versons dans un tube un peu du liquide surnageant limpide, puis agitons le mélange centrifugé pour remettre le précipité en suspension.

Comparons, au point de vue de leur influence sur la coagulation, le liquide limpide décanté (lequel contient un peu de NaFl mais point de $CaFl^2$) au liquide trouble dont la constitution chimique est la même, sauf qu'il renferme en outre du $CaFl^2$ insoluble. Versons dans 2 tubes 4 c. c. de plasma salé ; à l'un des tubes, A, ajoutons 2 c. c. du liquide clair ; à l'autre B, 2 c. c. du liquide trouble ; un peu plus tard, introduisons dans les tubes 18 c. c. d'eau distillée. Le mélange A se coagule au bout du temps normal : l'autre se maintient indéfiniment liquide. — Le rôle anticoagulant du précipité apparaît donc avec une parfaite évidence.

On conçoit dès lors pourquoi le sang ou le plasma fluorés à 3 0/00 ne se coagulent point par addition de chlorure calcique, lequel y fait naître un précipité doué d'un pouvoir anticoagulant plus énergique que celui du fluorure soluble lui-même. Mais, objectera-t-on, le sang et le plasma salé qu'on additionne de 2 à 3 0/00 de fluorure sodique contenaient déjà une certaine proportion de chaux ; il s'y est donc fait un léger précipité de $CaFl^2$: pourquoi dès lors ce sang ou ce plasma fluorés peuvent-ils se coaguler (lentement il est vrai) lorsqu'on les dilue fortement dans un liquide non fluoré (solution physiologique ou eau distillée) ? Cela tient, en réalité, à ce que le sang n'étant pas très riche en sels calciques, le précipité de $CaFl^2$ qui s'y forme par mélange avec le fluorure sodique n'est guère abondant ; au reste une fraction de ce précipité se redissout, nous l'avons vu, grâce à la dilution. Les expériences qui suivent nous montreront que le précipité absorbe les matières qui président à la coagulation.

Mais il faut, pour que cette absorption soit totale, le faire intervenir en dose assez notable.

Absorption des principes actifs par le précipité de fluorure calcique. — Pour obtenir une émulsion de fluorure calcique bien pur, précipitons une solution de $CaCl^2$ par un excès de NaFl. Le précipité qui se dépose est soumis à des lavages répétés (suivis de centrifugations et de décantations) dans de l'eau distillée additionnée de 1 0/0 de NaCl. Après une dernière centrifugation, le dépôt, bien débarrassé de NaFl, est délayé dans un certain volume de la solution de NaCl, et le liquide très louche obtenu est étudié au point de vue de son pouvoir anticoagulant[1].

Il suffit d'ajouter un peu de cette émulsion de $CaFl^2$ à l'eau distillée dans laquelle on dilue le plasma salé à 5 0/0, pour que la coagulation soit complètement enrayée. C'est bien le précipité lui-même qui agit; la partie liquide de l'émulsion (débarrassée du précipité par centrifugation) ne possède point de pouvoir anticoagulant, ainsi que le démontrait déjà l'expérience citée quelques lignes plus haut, expérience que nous pouvons refaire en employant cette fois du fluorure calcique bien lavé :

Centrifugeons un certain volume de notre émulsion de $CaFl^2$ dans la solution de NaCl à 1 0/0, et décantons le liquide surnageant limpide. Versons dans 2 tubes, d'une part 3 c. c. de ce liquide surnageant, d'autre part 3 c. c. de l'émulsion trouble non centrifugée. Ajoutons ensuite aux 2 tubes 10 c. c. de plasma dilué, qu'on a préparé quelques instants auparavant en mélangeant 1 volume de plasma salé à 5 0/0 avec 4 volumes d'eau distillée. Ce plasma abandonné à lui-même, sans aucune addition (ou additionné pour 10 c. c., de 3 c. c. de solution de NaCl à 1 0/0) se coagule spontanément au bout d'une demi-heure. Le plasma mis au contact du liquide clair surnageant se coagule au bout du même temps, celui qu'on a mélangé à l'émulsion trouble reste liquide. *Il ne se coagule pas davantage si par une centrifugation prolongée on le débarrasse de toute trace de précipité.* Celui-ci a donc absorbé certains principes indispensables à la coagulation. Est-ce le fibrinogène, est-ce le principe coagulant ?

Le précipité, s'il agit à dose assez forte, *peut enlever au plasma*

1. Le fluorure calcique n'est pas, nous l'avons dit antérieurement, complètement insoluble ; aussi, lorsqu'on laisse déposer le précipité contenu dans ce liquide et qu'on additionne d'oxalate la couche supérieure décantée et limpide, il se forme un trouble bien visible d'oxalate calcique.

la totalité de son fibrinogène. Ce plasma ainsi traité, débarrassé ultérieurement du précipité par la centrifugation, ne se coagule plus lorsqu'on l'additionne d'une quantité quelconque de fibrinferment très actif (sérum provenant d'une coagulation antérieure et normale de plasma dilué). Bien plus, il ne se trouble plus quand on le chauffe vers 65°, ainsi qu'on le démontre comme suit :

Préparons un certain volume de plasma dilué oxalaté, incoagulable spontanément (7 c. c. de plasma salé à 5 0/0 + 28 c. c. d'eau distillée + 4 c. c. de solution d'oxalate sodique à 1 0/0). Versons dans 2 tubes, d'une part (tube A) 2 c. c. de liquide clair surnageant (provenant de la centrifugation et décantation de notre émulsion de $CaFl^2$), d'autre part 2 c. c. de cette émulsion trouble (tube B). Ajoutons aux 2 tubes 10 c. c. de plasma dilué oxalaté. Laissons le contact se prolonger quelques heures, puis centrifugeons les 2 mélanges, et décantons les liquides limpides, bien débarrassés désormais de tout précipité. On constate que le liquide provenant du tube A, et qui n'a point été en contact avec le précipité de $CaFl_2$, se trouble fortement lorsqu'on le chauffe vers 60-65° ; exposé à cette température, le liquide traité par le précipité reste parfaitement transparent. Un second essai montre que le premier liquide se solidifie bientôt par addition de $CaCl^2$, lequel ne produit aucune coagulation dans le second ; celui-ci résiste de même à l'action du fibrin-ferment.

Mélangeons maintenant à du plasma dilué qu'on vient de préparer, une dose d'émulsion de $CaFl^2$ notablement plus faible que celle mise en œuvre dans l'expérience précédente ; nous constatons encore l'absence de coagulation. Mais éliminons le précipité de $CaFl^2$ par centrifugation, et ajoutons, au plasma limpide décanté, du sérum riche en fibrin-ferment. La coagulation s'effectue, avec une certaine lenteur il est vrai.

La totalité du fibrinogène n'a donc pas été absorbée, la quantité de $CaFl^2$ employée étant insuffisante. Mais pourquo dans ces conditions, le plasma ne s'est-il point coagulé spontanément, sans le secours du fibrin-ferment ? On doit soupçonner en présence de ce résultat, que *le fluorure calcique absorbe le principe coagulant* (fibrin-ferment ou proferment) avec plus d'énergie encore qu'il ne fixe le fibrinogène.

Pour démontrer qu'il en est bien ainsi, il suffit de mélanger a de l'émulsion de $CaFl^2$, un certain volume de fibrin-ferment

bien actif (serum provenant d'une coagulation antérieure de plasma dilué). Après quelque temps de contact, on centrifuge; le sérum ainsi débarrassé du précipité a perdu tout pouvoir coagulant. Ajouté à du plasma dilué qu'on vient de préparer, il n'en empêche point la coagulation (laquelle exige une demi-heure environ) mais il ne l'accélère aucunement. Or, le même sérum, non traité par le $CaFl^2$, solidifie en quelques instants, nous le savons, le plasma dilué récemment obtenu.

Il résulte de ces expériences que le précipité de $CaFl^2$ entraîne très facilement, par une sorte de collage, le proferment, le fibrin-ferment, et même, lorsqu'il agit à dose suffisamment élevée, la totalité du fibrinogène. Cette propriété du fluorure calcique explique d'une manière très satisfaisante les caractères si particuliers du sang et du plasma fluorés, obtenus d'abord par M. Arthus. Si le sang fluoré ne se coagule pas spontanément c'est que le fluorure sodique en a précipité la chaux; s'il se coagule sous l'influence du fibrin-ferment, c'est que le précipité de $CaFl^2$ qui s'y trouve, et qui résulte de l'action du fluorure alcalin sur la chaux naturelle du sang, est très peu abondant et ne saurait en conséquence, absorber le fibrinogène (ni peut-être même le proferment) d'une manière bien appréciable. S'il ne se coagule point par addition de $CaCl^2$, c'est que, comme nous l'avons déjà fait remarquer plus haut, l'introduction de ce sel augmente la teneur du sang fluoré en fluorure calcique insoluble, provoque donc une absorption plus intense des principes actifs, et par conséquent, loin de favoriser la coagulation, tend au contraire à l'enrayer davantage.

* * *

Action anticoagulante de divers précipités. — Le fluorure calcique n'est pas le seul sel insoluble qui jouisse d'un pouvoir anticoagulant; cette propriété appartient à d'autres précipités, tels que le sulfate ou le carbonate de baryte, l'oxalate calcique, pour ne citer que ceux dont nous avons éprouvé le pouvoir. Tous ces précipités, soigneusement lavés à la solution de NaCl à 1 0/0 et maintenus en suspension dans ce liquide, empêchent la coagulation du plasma dilué. Seulement ils sont nettement moin actifs que le fluorure calcique, notamment au point de vue de l'absorption du fibrinogène, dont ils dépouillent moins facilement

le plasma auquel on les mélange[1]. Celui-ci, séparé ensuite (par centrifugation) du précipité qu'on y avait introduit, se montre, en général, apte encore à se coaguler sous l'influence d'une addition de sérum riche en fibrin-ferment.

Mais ces précipités peuvent absorber totalement le fibrin-ferment du sérum et le priver ainsi de son pouvoir coagulant. Par exemple, si l'on mélange à 4 c. c. de sérum (provenant d'une coagulation normale de plasma dilué) 2 c. c. d'une émulsion laiteuse de sulfate de baryte, puis qu'on centrifuge, le liquide décanté ne hâte plus la coagulation du plasma dilué récemment préparé. On peut aussi faire intervenir, comme réactif dénotant la disparition du fibrin-ferment, le plasma oxalaté.

Il faut remarquer cependant que, pour obtenir une absorption totale, il faut employer une assez grande quantité de précipité. Le précipité d'oxalate calcique qui se forme lorsqu'on recalcifie du plasma oxalaté à 1 0/00 n'est pas assez abondant pour entraîner une fraction importante des substances actives. Aussi le plasma oxalaté se coagule-t-il, on le sait, dans ces conditions, l'influence antagoniste du précipité n'étant guère appréciable[2].

*
* *

Action agglutinante du sérum sur les précipités. — Il nous reste à dire quelques mots d'un phénomène que nous avons observé au cours de nos recherches sur le pouvoir anticoagulant des précipités insolubles, et qui nous paraissait an début assez énigmatique.

Diluons du plasma salé à 5 0/0 dans la quantité voulue, (4 parties) d'eau distillée. Dès que ce plasma dilué est obtenu, versons-y une certaine quantité d'émulsion de précipité. Ajoutons par exemple 8 gouttes d'émulsion laiteuse assez épaisse de sulfate barytique à 1 c.c. de plasma dilué; dans ces conditions, le précipité ne subit aucun changement, les particules qui le constituent restent dissociées comme elles l'étaient dans l'émulsion; ainsi qu'il a été dit plus haut, la coagulation ne

1. Cependant, en employant de fortes doses d'émulsion épaisse de sulfate barytique, on peut enlever la totalité du fibrinogène. L'influence absorbante du sulfate barytique à l'égard de certaines matières minérales en solution colloïdale a été signalée par Vanino (*Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1902).

2. Comme M. Arthus l'a déjà suggéré, elle peut devenir manifeste lorsqu'on recalcifie des plasmas contenant de fortes doses d'oxalate alcalin; dans de pareils cas, la coagulation s'opère difficilement (Arthus).

s'effectue point. D'autre part, dans un second essai, prenons encore du plasma dilué identique au précédent, mais attendons que la coagulation commence à s'y effectuer ; dès que les parois du vase se revêtent de coagulum, défibrinons au moyen d'une baguette de verre, jusqu'à ce que toute la fibrine soit extraite; attendons encore quelque temps pour être sûrs que le sérum ainsi obtenu ne se coagule plus, est donc bien débarrassé de sa fibrine. Ajoutons alors à 1 c.c. de sérum, 8 gouttes d'émulsion barytique. Presque instantanément, le précipité s'agglomère en blocs volumineux qui ne se désagrègent point par agitation, se déposent rapidement, le liquide surnageant ne présentant plus aucun trouble.

Du plasma dilué qui se coagule et qu'on défibrine acquiert donc le pouvoir, qu'il ne possédait pas avant la coagulation, d'agglutiner, avec une grande énergie, des précipités inertes, tels que le sulfate barytique, l'oxalate calcique, etc. Cette propriété nouvelle disparaît du sérum assez rapidement, au bout de 2 ou 3 jours, souvent même au bout de 24 heures environ. Le chauffage à 60° (pendant 1/2 heure) l'atténue considérablement ou la fait disparaître; le chauffage à 55°, pendant le même temps, ne l'abolit pas. Chose curieuse, le sérum qu'on a chauffé à 55° (et dont on a détruit ainsi le fibrin-ferment, car ce liquide ainsi traité n'est plus capable de provoquer la coagulation du plasma oxalaté) conserve son pouvoir agglutinant vis-à-vis du précipité, beaucoup plus longtemps que s'il n'avait pas été chauffé.

La coagulation, avec défibrination, du plasma (qu'il s'agisse de plasma normal ou de plasma oxalaté dont on provoque la coagulation par l'addition de sérum) s'accompagne toujours de l'apparition de ce singulier pouvoir agglutinant. C'est le cas même pour du plasma dilué qu'on a déjà mélangé (dès qu'il a été obtenu) à une forte dose de sulfate de baryte, et qui, après élimination du précipité par centrifugation, devient coagulable grâce à l'addition d'une trace de sérum, et est soumis à la défibrination.

Une expérience très simple va nous dévoiler la cause de cette remarquable influence agglutinante qu'exercent sur les précipités, les sérums obtenus par défibrination.

Diluons, suivant les proportions connues, le plasma salé dans

l'eau distillée. Une portion du plasma dilué est versée dans un verre à pied ; dès que la coagulation commence à s'y manifester, on défibrine activement et complètement, au moyen d'une baguette de verre; on obtient ainsi le sérum A. L'autre portion est abandonnée à elle-même, sans subir aucune agitation, et se transforme bientôt en caillot compact d'où s'exsude ensuite un sérum B. Si, à des volumes égaux des deux sérums, nous ajoutons même quantité d'émulsion de sulfate barytique, nous constatons une agglomération très énergique du précipité dans le sérum A : dans le sérum B, le précipité ne s'agglutine nullement. Prenons maintenant une certaine quantité de sérum A, qui possède à un haut degré, nous venons de le voir, le pouvoir agglomérant. Versons-y un volume relativement faible de plasma dilué, tout récemment préparé, et n'agitons point le liquide pendant qu'il se coagule; nous trouvons que le sérum qui s'échappe du caillot a perdu entièrement sa propriété agglomérante. D'autre part, conservons pendant un jour ou deux nos deux sérums. Au bout de 24-36 heures (parfois moins), nous observons que le sérum B a gardé toute sa limpidité ; dans le sérum A, au contraire, quelques flocons très légers, transparents au point d'être à peine visibles, ont apparu. L'agitation les agrège en un filament de fibrine ; en même temps, on constate que le liquide a perdu entièrement son pouvoir agglutinant,

L'interprétation est désormais fort simple. Lorsque nous défibrinons le plasma au moyen d'une baguette de verre, nous ne récoltons pas sur cette baguette la totalité de la fibrine produite ; une fraction du fibrinogène modifié par le fibrin ferment échappe à la défibrination, se dissémine dans le plasma, se maintient ainsi à l'état d'équilibre instable, pendant un temps qui peut atteindre un jour ou deux, sans troubler aucunement la limpidité de la liqueur. Si l'on introduit un précipité, l'adhésion moléculaire réciproque intervient, les particules solides et la fibrine à l'état colloïdal s'accolent et, pour ainsi dire, se coagulent mutuellement. Dans le cas où l'on ne fait pas agir le précipité, les molécules de fibrine exigent un temps souvent fort prolongé pour se condenser sous forme de flocons légers et transparents. Quand cette condensation s'est opérée, quand, en d'autres termes, il n'existe plus de fibrine disséminée dans le sérum, celui-ci se montre désormais privé de sa propriété agglo-

mérante. Mais si l'on abandonne à lui-même, sans l'agiter, le plasma qui se coagule, le caillot gélatineux que la défibrination ne vient point déchirer englobe et retient, par un phénomène de collage, la totalité de la fibrine;; aucune fraction de celle-ci ne se retrouve dès lors dans le sérum. Aussi n'observe-t-on plus, dans ces conditions, l'apparition ultérieure de flocons; à aucun moment, le sérum ainsi préparé ne jouit du pouvoir agglutinant.

On conçoit également pourquoi le sérum obtenu par défibrination conserve mieux son pouvoir agglomérant lorsqu'on le chauffe à 55°. On supprime ainsi le fibrin-ferment, c'est-à-dire une influence très favorable à la condensation en flocons, des molécules disséminées de fibrine. Celles-ci peuvent donc se maintenir plus longtemps éparses, dispersées dans la liqueur, et provoquent le collage des particules solides avec lesquelles on les met en contact.

On admet que lors de la coagulation, le poids de la fibrine solide formée est nettement inférieur à celui du fibrinogène que le plasma contenait à l'origine; on en conclut que la transformation en fibrine n'est pas l'unique modification que subit le fibrinogène. Il ne sera sans doute pas inutile, pour ceux qui désireraient reprendre cette question de la métamorphose du fibrinogène en fibrine, de savoir qu'on ne récolte pas nécessairement, en défibrinant avec une baguette un plasma qui se coagule, la quantité totale de fibrine réellement engendrée.

*
* *

CONCLUSIONS

1° Pour expliquer les propriétés particulières du sang ou du plasma fluorés, il n'y a pas lieu de faire intervenir l'influence toxique que le fluorure alcalin peut exercer sur les cellules sanguines ;

2° Il n'est point démontré que le plasma fluoré ne contient pas de proferment. S'il ne se coagule pas spontanément, c'est parce que les fluorures alcalins sont des agents décalcifiants. Mais c'est à cause de la production de fluorure calcique, et non pas en raison de l'absence de proferment, que le plasma fluoré ne se coagule pas par addition d'un sel soluble de calcium. Un plasma débarrassé au préalable de ses éléments cellulaires,

fluoré ensuite, et qui contient sûrement du proferment, ne se coagule pas quand on l'additionne de chlorure calcique;

3° On ne peut, en conséquence, invoquer les caractères du plasma fluoré en faveur de cette thèse, que les leucocytes contiennent normalement le proferment, et que l'intoxication de ces éléments les empêche de mettre cette substance en liberté dans le liquide ambiant;

4° Le fluorure calcique, comme d'autres précipités insolubles capables également d'empêcher la coagulation, absorbe le fibrin-ferment. Employé à dose suffisante, le précipité de $CaFl^2$ peut fixer en outre la totalité du fibrinogène présent dans le plasma. — Les autres précipités étudiés, et notamment le sulfate ou carbonate barytique et l'oxalate calcique, ne manifestent qu'à un degré plus faible ce pouvoir fixateur à l'égard du fibrinogène;

5° Quand on défibrine du plasma dilué en voie de coagulation, une fraction de la fibrine produite n'est pas récoltée, se maintient longtemps à l'état disséminé dans le liquide. Cette fibrine, qui passe inaperçue, peut se coller sur les particules de divers précipités et les agglomérer de la sorte avec beaucoup d'énergie.

DE LA VALEUR THÉRAPEUTIQUE

DES

injections de Sérum dans la diphtérie

SUIVANT LES DOSES ET LA VOIE DE PÉNÉTRATION

Par le Dr LOUIS CRUVEILHIER

Actuellement, les cliniciens considèrent comme un devoir de recourir au sérum dans les cas de diphtérie. — Mais, si l'accord est fait quant à l'opportunité de la sérothérapie antidiphtérique. on ne s'entend pas encore au sujet de la *dose de sérum* à employer et sur l'avantage qu'il peut y avoir à *répéter les injections*.

Le choix de la *voie de pénétration* de l'antitoxine a donné enfin lieu à des divergences d'opinion.

Il nous a donc semblé qu'il serait utile de demander à des expériences comparatives la solution de ces problèmes.

Toutes nos expériences ont été faites sur le même animal, le cobaye, et, constamment, nous nous sommes servis de sujets neufs.

Tour à tour et comparativement, nous avons employé le microbe lui-même, puis la toxine diphtérique.

I

RÉSULTATS OBTENUS APRÈS INOCULATION DU MICROBE

Le microbe auquel nous avons eu recours dans notre première série d'expériences est le bacille diphtérique n° 261, que nous devons à l'obligeance de M. le docteur Momont.

Nous avons employé d'abord des ensemencements en bouillon additionné de peptone Chapoteaut, puis des cultures sur gélose. Dans l'un et l'autre cas nos animaux témoins sont morts entre 36 et 48 heures, et présentaient à l'autopsie les lésions caractéristiques de la diphtérie.

a) *Injections intra-cérébrales comparées aux injections sous-*

cutanées de 1/10 *de c. c.* — On a insisté, à propos du tétanos, sur l'importance qu'il y a à mettre le sérum « au bon endroit ». Il était intéressant de rechercher si, dans la diphtérie comme dans le tétanos le bon endroit était le cerveau.

Nous avons donc injecté à un premier lot de cobayes, inoculés au préalable de la diphtérie, 1/10 de c. c. de sérum sous la peau, et comparativement nous avons fait pénétrer la même dose d'antitoxine dans le cerveau d'un second lot d'animaux de même espèce.

Ces expériences, qui ont porté sur de nombreux sujets, tous approximativement de même poids, nous ont montré que, dans la diphtérie comme au cours du tétanos, « l'injection intra-cérébrale augmente la période d'intervention efficace ». Ainsi, on peut, avec la même quantité de sérum, prévenir la mort par une injection intra-cérébrale alors que l'injection sous-cutanée reste sans résultat.

Le gain obtenu par les injections intracérébrales au cours de la diphtérie n'a toutefois rien de comparable avec celui qu'on observe dans le tétanos. La voie cérébrale ne nous a jamais, en effet, permis de gagner sur la voie sous-cutanée plus de 4 heures avec la même dose de sérum (1/10 de c. c.). D'autres fois, le gain n'a même été que de 2 heures. Le temps utile des injections de sérum s'est trouvé ainsi reporté de 10 heures à 14 heures, ou tout au moins à 12 heures.

Ces résultats nous ont prouvé que si, comme l'ont montré MM. Roux et Borrel, la toxine diphtérique a pour le système nerveux une grande affinité, il n'en est pas de même de l'antitoxine.

b) *Injections sous-cutanées massives comparées aux injections intracérébrales.* — En présence d'une intoxication sévère, comme c'est le cas dans nos expériences où les cobayes meurent en moins de 48 heures, il nous a paru intéressant de rechercher s'il serait possible d'arriver à balancer la valeur des injections intracérébrales par des injections *sous-cutanées massives*, dont on a maintes fois constaté l'efficacité en clinique. Comparativement à des injections intracérébrales de 1/10 de c. c., nous avons donc injecté à d'autres cobayes, sous la peau, 1 c. c. de sérum. Cette dose équivaut, pour un animal de

500 grammes à 20 c. c. pour un enfant pesant 10 kilogrammes, c'est-à-dire âgé de moins de 18 mois.

Nous avons alors constaté que le gain obtenu par les injections intra-cérébrales sur les injections sous-cutanées massives était d'ordinaire seulement de 2 heures, et exceptionnellement de 4 heures. Ainsi le temps utile des injections sous-cutanées est reporté le plus souvent à 12 haures.

Dans de nouvelles expériences, nous avons cherché s'il était possible d'arriver à de meilleurs résultats en augmentant la dose d'antitoxine, et nous avons injecté sous la peau de nouveaux sujets 2 c. c., 4 c. c., 6 c. c. et jusqu'à 10 c. c. de sérum en une seule fois.

Deux de nos animaux qui avaient reçu 10 c. c. d'antitoxine 12 heures après l'inoculation sont morts.

Pour les autres, notre intervention a encore été utile 12 heures après l'inoculation, mais, ce laps de temps écoulé, nous n'avons pu sauver aucun de nos cobayes.

Le dose de 1 c. c. qui, dans les conditions où nous avons opéré, correspond aux quantités de sérum prescrites au congrès de Budapest de 1894, si elle est nécessaire, est donc aussi suffisante.

c) *Injections sous cutanées et intra-cérébrales répétées.* — Les cliniciens ont insisté sur l'importance qu'il y a d'injecter d'emblée une forte dose de sérum, mais ils ont aussi éprouvé, dans les cas graves, les bons effets de la répétition de ces injections.

Nous avons donc recherché tour à tour si, par la répétition des interventions sous-cutanées et intra-cérébrales, on obtiendrait de meilleurs résultats que par les injections sous-cutanées massives. Nous avons renouvelé nos injections sous-cutanées au bout de 6 heures et de 18 heures, et nous avons constaté que dans ces conditions on peut encore intervenir avec efficacité, constamment 12 heures après l'inoculation.

Les injections intra-cérébrales ne donnent donc plus qu'un gain de 2 heures et parfois, même, elles n'ont pas de meilleur effet que les injections sous-cutanées.

Par la répétition des interventions dans le cerveau au bout de 1/2 heure, 1 heure, 1 h. 1/2, 2 heures et 3 heures nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats que par une seule injection intra-cérébrale dans 4 nouveaux essais.

d) *Injections intraveineuses comparées aux injections intra-cérébrales et sous-cutanées.* — Les bons effets obtenus au cours des dernières épidémies de peste par la sérothérapie intraveineuse nous ont amenés à rechercher si expérimentalement, dans la diphtérie, la voie intraveineuse ne présentait pas un avantage sur les voies intra-cérébrale et sous-cutanée, ainsi que semblaient déjà le prouver les observations cliniques de L. Cairns de Glascow (1902) et celles de Goncour de Bordeaux (1903).

Dans nos expériences, les injections intraveineuses de 1 c. c. nous ont fait obtenir constamment un gain de 6 heures sur les injections sous cutanées de 1/10 de c. c., et un gain de 4 heures sur les injections massives et répétées, pratiquées sous la peau.

Nous avons constaté en outre qu'on peut encore recourir utilement à la voie intraveineuse à une phase de la maladie où depuis 4 heures les injections intracérébrales restent le plus souvent sans résultat. Pour faire pénétrer facilement l'antitoxine dans les veines de nos cobayes, nous avons poussé nos injections dans la veine jugulaire, qu'on aperçoit facilement sur le côté, après une incision verticale et médiane des plans superficiels du cou.

II

RÉSULTATS OBTENUS APRÈS INJECTION DE TOXINE

Dans une seconde série d'expériences nos cobayes ont été inoculés avec la toxine diphtérique du 8. XII. 02, qui nous a été fournie en quantité suffisante pour toutes nos interventions par M. le docteur Martin, que nous remercions de son obligeance. Après divers essais, nous nous sommes arrêtés à la dilution à 1/200. Nous en avons injecté 1 c. c. à nos cobayes dont les témoins sont morts entre 72 et 96 heures,

a) *Injections intra-cérébrales comparées aux injections sous-cutanées de* 1/10 *de c. c.* — Dans ces conditions, avec une même dose d'antitoxine (1/10 de c. c.), nous avons pu par la voie intra-cérébrale sauver nos animaux 2 heures après que les injections sous-cutanées avaient cessé d'être efficaces.

b) *Injections intraveineuses comparées aux injections intra-cérébrales et sous-cutanées.* — Comme dans notre première série d'expériences, les injections intraveineuses nous ont donné un gain constant sur tous les autres modes de pénétration de l'antitoxine. Ce gain a été le plus souvent de 2 heures, mais quelquefois de 4 heures sur les injections sous-cutanées.

La voie veineuse nous a permis dans tous les cas d'intervenir 4 heures plus tard que la voie intracérébrale.

c) *Injections sous cutanées massives comparées aux injections intra-cérébrales.* — Sur un autre lot de cobayes nous avons éprouvé l'importance des doses massives qui nous a semblé plus considérable encore pour lutter contre la toxine que pour s'opposer au microbe.

Dans la moitié de nos essais en effet, nous avons pu gagner encore 2 heures par la voie intra-cérébrale, mais dans les autres cas le résultat des 2 modes d'injection s'est trouvé en tous points comparable.

Après injection de toxine, comme à la suite d'inoculation du microbe diphtérique, dans nos interventions, la dose de 1 c. c, de sérum a été nécessaire mais aussi suffisante pour obtenir des injections sous-cutanées d'antitoxine leur maximum d'effet utile.

d) *Injections sous-cutanées et intra-cérébrales répétées.* — La répétition des interventions a rendu encore plus manifeste l'avantage des injections sous cutanées massives, car alors le gain de ces dernières sur les injections intra-cérébrales a été le plus ordinairement de quatre heures.

Par la répétition des injections intra-cérébrales, nous avons obtenu de moins bons résultats que par une seule injection.

III

En résumé, dans les conditions où nous avons opéré :

a) Nous avons pu intervenir utilement 10 heures après l'inoculation de culture diphtérique par une seule injection de 1/10 de c. c. de sérum sous la peau.

b) Le temps utile de nos interventions a été reporté à 12 heures le plus souvent par l'injection de doses massives. Ce résultat a

été obtenu constamment par la répétition des interventions.

c) 12 heures après l'introduction du microbe, et parfois même 14 heures après nous avons pu agir utilement par la voie intracérébrale.

d) Les injections intraveineuses sont demeurées efficaces dans la majorité des cas 16 heures après l'inoculation.

a) Nous avons pu intervenir utilement par la voie sous-cutanée en employant 1/10 de c. c. de sérum, 8 heures après l'injection de toxine.

b) Grâce aux doses massives, ce temps utile s'est trouvé reporté de 8 à 12 heures dans la majorité des cas. La répétition des interventions nous a permis d'obtenir constamment ce résultat.

c) Les injections intracérébrales se sont montrées inférieures aux injections sous-cutanées massives ou répétées puisqu'elles ne nous ont laissé intervenir utilement que 10 heures après la pénétration de la toxine. La répétition de ces injections ne nous a donné aucun gain.

d) La voie intraveineuse constamment nous a permis d'intervenir 2 heures après que tous les autres modes d'injection avaient cessé d'être efficaces.

IV

De nos expériences nous pouvons conclure que :

1° Au cours de la diphtérie comme dans le tétanos, « il y a un temps après lequel l'antitoxine ne peut rien, quelle que soit la façon dont elle est employée » ;

2° Dans les cas de diphtérie provoquée que nous avons observés, il n'a pas été indifférent, mais utile et nécessaire, d'injecter d'emblée une dose massive de sérum.

3° On doit répéter cette injection tout au moins dans les cas de diphtérie grave, tels que ceux sur lesquels nous avons expérimenté ;

4° Les injections intracérébrales nous ont permis d'intervenir presque toujours un certain temps après que les injections sous-cutanées avaient cessé d'être efficaces.

5° La voie veineuse, qui nous a fait obtenir un gain constant sur tous les autres modes de pénétration de l'antitoxine, est dans la diphtérie, comme au cours de la peste, « le bon endroit » pour l'antitoxine. Elle semble lui faire produire un maximum d'effet utile et constitue ainsi une ressource thérapeutique précieuse.

Dans les tableaux ci-joints, on trouvera, dans les premières colonnes, le nombre des heures écoulées entre le moment de l'inoculation ou celui de l'injection de toxine et celui de l'injection du sérum, dans chacune des expériences signalées par leur n° d'ordre dans les colonnes suivantes. Dans le premier tableau l'inoculation a été faite au cobaye avec 1/4 de culture sur gélose dans un tube. On a ensuite fait des injections de sérum aux doses et dans les conditions indiquées en tête de la colonne. Le nombre d'animaux employés et leur sort sont indiqués ensuite; 6S veut dire, 6 survivants sur 6 à la suite du traitement; 3S + 3M signifie 3 survivants et 3 morts. Chaque expérience compte en outre des témoins qui mouraient d'ordinaire avant les traités, en 36-48 heures dans le premier tableau, en 72-96 heures dans le second.

MOYENNE DES EXPÉRIENCES APRÈS INOCULATION DE *CUCTURE* DIPHTÉRIQUE

	EXP. 1 A 9	EXP. 14 A 19	EXP. 10 A 13	EXP. 20 A 23	EXP. 1 A 9	EXP. 24 A 27	EXP. 28 A 33
Délais du sérum.	0cc,1 s. la peau	1cc s. la peau	2, 4, 6, 10cc peau	3 f. 1cc peau	0cc,1 cerveau	3 f. 0cc,1 cerveau	1cc veine jug.
2 heures.	6 s	6 s	4 s	4 s	5 s	4 s	6 s
4 —	6 s	6 s	4 s	4 s	5 s	4 s	6 s
6 —	6 s	6 s	4 s	4 s	5 s	4 s	6 s
8 —	6 s	6 s	4 s	4 s	5 s	4 s	6 s
10 —	6 s	6 s	4 s	4 s	5 s	4 s	6 s
12 —	6 m	3 s + 3 m	2 s + 2 m	4 s	5 s	4 s	6 s
14 —	6 m	6 m	4 m	4 m	2 s + 3 m	2 s + 2 m	6 s
16 —	6 m	6 m	4 m	4 m	5 m	4 m	4 s + 2 m
18 —	6 m	6 m	4 m	4 m	5 m	4 m	6 m
20 —	6 m	6 m	4 m	4 m	5 m	4 m	6 m

MOYENNE DES EXPÉRIENCES APRÈS INJECTION DE 1/200 DE *TOXINE* DIPHTÉRIQUE

	EXP. 34 A 36	EXP. 37 A 39	EXP. 40 A 42 ET 50	EXP. 34 A 36	EXP. 40 A 42	EXP. 47 A 49	EXP. 43 A 46
Délais du sérum,	1cc s. paeu	1cc s. peau	6 et 10cc s. peau	3 f. 1cc s. peau	0cc,1 d. cerveau	3 f. 0cc,1 cerveau	1cc veine jug.
2 heures.	3 s	3 s	4 s	3 s	3 s	3 s	4 s
4 —	3 s	3 s	4 s	3 s	3 s	3 s	4 s
6 —	3 s	3 s	4 s	3 s	3 s	3 s	4 s
8 —	3 s	3 s	4 s	3 s	3 s	3 s	4 s
10 —	3 m	3 s	4 s	3 s	3 s	1 s + 2 m	4 s
12 —	3 m	2 s + 1 m	2 s + 2 m	3 s	3 m	3 m	4 s
14 —	3 m	3 m	4 m	3 m	3 m	3 m	4 s
16 —	3 m	3 m	4 m	3 m	3 m	3 m	4 m
18 —	3 m	3 m	4 m	3 m	3 m	3 m	4 m
20 —	3 m	3 m	4 m	3 m	3 m	3 m	4 m

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE FÉVRIER 1904 No 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Essai de campagne antipaludique selon la méthode de Koch

(LAC DE GRAND-LIEU 1903.)

PAR LES Drs EDMOND ET ÉTIENNE SERGENT.

L'Hémamibe du paludisme ayant deux hôtes : l'Homme et le Moustique, elle peut être attaquée chez l'un ou chez l'autre de ses convoyeurs. La lutte contre les Moustiques constitue un mode de la prophylaxie du paludisme, la désinfection du sang des fiévreux en constitue un autre. Et c'est sur ce principe : la guérison des hommes malades poursuivie dans le but d'enlever aux *Anophelinæ* la chance de s'infecter, qu'est basée la méthode de Robert Koch. Le savant allemand considère le problème de prophylaxie du paludisme du même point de vue que celui de la prophylaxie de la fièvre typhoïde ou du choléra. Il pense qu'il faut atteindre les agents de ces trois affections non dans la nature extérieure, mais chez l'homme ; la prophylaxie du choléra, de la fièvre typhoïde, comportera l'isolement des malades, la désinfection de leurs *dejecta*, des objets qu'ils ont pu contaminer, et, de même, l'isolement et le traitement des personnes en état de microbisme latent, c'est-à-dire chez qui l'examen microscopique révèle la présence des mêmes microbes, en dehors de tout symptôme morbide.

Par analogie, pour entreprendre la prophylaxie du paludisme dans une région donnée, R. Koch conseille de rechercher toutes les personnes en état de paludisme latent, c'est-à-dire de procéder à l'examen microscopique du sang de la population entière; cet examen montrera des hémamibes chez tous les anciens fiévreux non complètement guéris et qui auront

encore des rechutes. Ces malades « en puissance » sont traités par le médicament spécifique : la quinine, administrée méthodiquement, à intervalles réguliers, pendant toute la saison dangereuse : Man muss an jedem 10 und 11 Tage Morgens 1 Gramm Chinin nehmen.

Il ne faut pas confondre cette méthode de désinfection du sang des fiévreux avec la méthode de la quinine préventive, qui consiste à donner de la quinine à toutes les personnes saines ou non, qui sont exposées à contracter le paludisme. Cette méthode de la quinine préventive, connue et appliquée depuis longtemps, a fait ses preuves, et l'on peut en dire qu'elle vaut ce que vaut la façon dont on la pratique. Une personne intelligente et résolue en tirera de bons effets, mais on peut craindre des échecs s'il s'agit de traiter des collectivités.

La méthode de Koch part donc d'un tout autre principe que la méthode de la quinine préventive. Elle a inspiré des expériences, exécutées dans des pays très différents et dont les résultats fort encourageants ont été publiés dans la *Zeitschrift fur Hygiene und Infektionskrankheiten* [1]. L'importance attribuée à cette méthode veut qu'on s'y arrête, et nous a inspiré le désir de l'expérimenter à l'exclusion de toute autre, dans une localité donnée, afin d'en éprouver l'efficacité.



Nous avons choisi, comme lieu d'expérience, un canton de la Loire-Inférieure, situé aux confins de la Vendée, sur les bords du lac de Grand-Lieu. La région qui entoure le lac est plate, faite d'alluvions (argile, sables et graviers). Le lac couvre en hiver 8,000 hectares, il reçoit plusieurs rivières et se déverse au Nord dans la Loire. Cette surface de 8,000 hectares se réduit en été à 4,000 hectares, et la partie découverte porte le nom de marais; ce sont de vastes prairies où pousse la rouche, *Carex*, *Typha*, *Sparganium*, qui sert de fourrage et de litière. D'ailleurs, le lac lui-même est peu profond (2 mètres au

1 *Zeitsch. f. Hyg.*, t. XLIII, f. 1, 22 mai 1903, pp. 1-238; 3 planches et figures dans le texte. Nous avons donné une analyse de ces importants travaux dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur*, tome I, nº 11, pp. 467-472. Voir aussi le mémoire fondamental de Koch : Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Malariaexpedition, *Deutsch. Medic. Wochensch.* 1900, nºs 49 et 50.

plus); il se comble peu à peu, le marais qui lui sert de ceinture grandit chaque année à ses dépens. On a aidé l'œuvre de la nature en ensemençant dans les eaux du lac l'*Elodea canadensis* qui croît abondamment, se reproduisant par bouturage naturel, et favorise le colmatage[1]. Le rebord de la cuvette du

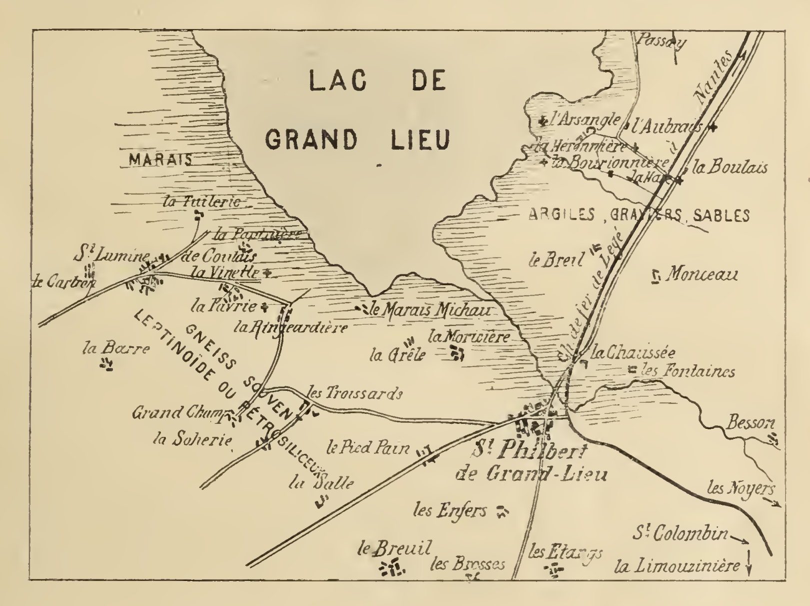


Fig. 1.

Bords du lac de Grand-Lieu. Les villages défendus sont marqués d'une croix. Tous les bourgs ou villages figurant sur la carte ont présenté des cas de fièvre paludéenne en été-automne 1903.

lac de Grand-Lieu s'élève, au Sud, vers le Bocage vendéen, avec des gneiss et des micaschistes; à l'Ouest de légères ondulations de terrain, dont l'ossature est formée de gneiss, séparent le lac de la baie de Bourgneuf qu'envahissent les alluvions. Ces terres gagnées sur l'Océan constituent le Marais vendéen.

Le centre de nos opérations fut le bourg de Saint-Philbert

1. En 1876, James Lloyd, auteur de la *Flore de l'ouest de la France*, écrivait dans sa préface : « Les côtés sud et ouest (du lac de Grand-Lieu), entre la Boulogne et l'Achenau, ne peuvent être suivis par le piéton, arrêté par une vase molle impraticable ou par une large bande de plantes marécageuses, qui s'avance de plus en plus. La plus envahissante est *Sparganium ramosum* (Rubanier), qui, à en juger par les progrès accomplis depuis 25 ans, finira, en moins d'un siècle, par transformer cette nappe d'eau en un vaste marais, surtout lorsqu'il sera aidé par *Elodea canadensis* qui ne peut manquer d'y être apporté. »

de Grand-Lieu, situé à 2 kilomètres 1/2 au sud du lac, sur la petite rivière la Boulogne qui se jette dans le lac après quelques méandres. Les environs de Saint-Philbert, comme d'ailleurs tout le pays jusqu'à Nantes, sont plats, coupés de haies épaisses d'arbres séparant les champs très bien cultivés. Les principales cultures sont les céréales, la vigne en grande quantité, les choux, les betteraves, les pommes de terre. La moitié de la population habite le bourg, l'autre moitié est disséminée dans les fermes éparses dans la campagne, parfois groupées par deux ou trois, et que l'on désigne sous le nom de villages. Ces fermes sont d'un pauvre aspect : elles se composent d'une seule chambre, rarement de deux, sans étage, sans grenier ; la terre battue tient lieu de plancher[1]. Pas de lieux d'aisances. C'est là que vivent entassés, et dans les plus mauvaises conditions d'hygiène, des paysans très durs au travail. En été les femmes elles-mêmes vont aux champs, jambes et pieds nus. Près de chaque ferme est creusée une fosse, ou mare, où vont boire les bêtes. D'ailleurs l'eau est partout dans ce pays, faiblement courante ou stagnante.

Toutes ces collections d'eau sont infestées de larves d'*Anopheles maculipennis*. Dans le bourg même de Saint-Philbert, un bassin maçonné, où ne poussaient que des chataignes d'eau (macre, *Trapa natans*), contenait de nombreuses larves d'*Anopheles maculipennis*. Nous n'avons trouvé de larves d'autres moustiques (*Culex pipiens*) que dans quelques fossés le long des routes. Mais les mares, les trous d'eau, en pleine campagne ne contenaient que des larves d'*A. maculipennis*. Nous n'avons pas pêché de larves dans le lac ni dans la rivière la Boulogne ; il n'y a là rien d'étonnant, ces grandes surfaces d'eau sont trop exposées à l'action du vent pour que les femelles soient tentées d'y venir pondre. Certains points du bord du lac, encombrés de roseaux et d'autres plantes d'eau, peuvent certainement être des gîtes à larves de moustiques, mais l'importance de ces gîtes est loin d'égaler celle des innombrables fossés ou mares qui couvrent le pays[2]. Parmi les plantes qui

1. A 30 kilomètres à l'ouest, dans le Marais vendéen, les *Bourines* sont plus misérables encore ; bâties en terre, couvertes de rouche, elles valent les gourbis arabes.

2. Dans le Marais vendéen, fait d'alluvions récentes où aucun arbre ne peut pousser, les champs sont séparés par des fossés (ou étiers) pleins d'eau. Quand l'été met à sec ces fossés, ce qui permettrait aux bestiaux de passer d'une pro-

vivent dans les gîtes à larves d'*Anopheles maculipennis*, nous signalons les suivantes, qui ont été déterminées par le Dr Cailleteau, de Saint-Philbert, à qui nous sommes redevables d'ailleurs de la plus grande partie de nos renseignements : les *Myriophyllum* et *Elodea canadensis*, qui sont submergés, l'*Elatine alsinastrum*, dont la tige émerge hors de l'eau ; puis les plantes à feuilles flottantes : *Ranunculus* de la section *Batrachium*, *Nymphæa alba*, *Nuphar luteum*, *Trapa natans*, *Limnanthemum nymphoïdes*, *Hydrocharis Morsus-ranæ*, *Alisma natans*, tous les *Potamogeton*, tous les *Lemna*.

Les *A. maculipennis*, mâles et femelles, ont été rencontrés tout l'été en grande abondance dans les maisons. Les femelles piquaient en plein jour : nous avons noté ce fait, en particulier, une après-midi que nous prenions du sang au doigt d'un paysan : un *Anopheles* est venu le piquer au même doigt que nous. Une autre fois, vers 5 heures du soir, nous avons surpris un *Anopheles* se gorgeant de sang sur un enfant en plein accès de fièvre (38° 6). Le jour, l'endroit où il est le plus facile de capturer des *Anopheles* adultes est la porcherie : sur un espace d'un mètre carré environ, nous avons vu des centaines d'*Anopheles*, comme piqués sur le fond blanc des toiles d'araignée. Une des causes de la prédilection des *Anopheles* pour les porcheries nous paraît tenir à la chaleur considérable que dégage le porc dans l'espace restreint où il est tenu enfermé.

Les *A. maculipennis* que nous avons capturés dans la région du lac de Grand-Lieu sont exactement semblables à ceux que nous avons trouvés dans la banlieue de Paris et dans la vallée de l'Essonne[1], contrées indemnes de paludisme. Ces *A. maculipennis* de France sont d'une taille un peu supérieure à celle des *A. maculipennis* d'Algérie ou d'Italie. Pourquoi les *A. maculipennis* de Vendée donnent-ils le paludisme, et ceux de Paris ne le donnent-ils pas ? On a proposé plusieurs explications pour

priété à l'autre, les habitants lèvent les écluses des digues qui protègent ce pays contre l'Océan, et l'eau de mer se mêle à l'eau douce en quantité de plus en plus considérable. Nous avons constaté la présence de larves d'*A. maculipennis* dans de l'eau saumâtre contenant 4 0/00 de sel marin. D'après les observateurs du pays, on trouverait encore de ces larves quand la salure devient beaucoup plus forte, jusqu'à être exactement celle de l'eau de mer.

1. Et. Sergent. Existence des *Anopheles* en grand nombre dans une région d'où le paludisme a disparu. *Ann. Inst Pasteur*, 1901, p. 811.

Ed. et Et. Sergent. Observations sur *les Anopheles* de la banlieue de Paris. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVI, décembre 1902, p. 940.

des faits analogues. Schaudinn[1] et Celli[2] supposent que les *Anopheles* des pays indemnes aujourd'hui de paludisme sont devenus réfractaires à l'infection hémamibienne. Le Dr Laveran[3] s'exprime ainsi : « On s'explique bien que, dans le nord de l'Europe, il existe des *Anopheles* dans des localités indemnes de paludisme; les *Anopheles* ne peuvent pas s'infecter en suçant le sang de malades atteints de fièvre palustre. »

Nous n'envisageons pas la question des genres ou espèces d'*Anophelinæ* qui seraient complètement incapables de propager le paludisme, comme *Anopheles* (*Myzomyia*) *Rossii*[4], et un *Anopheles* étudié à Sumatra par Schüffner[5]. A Paris et en Vendée vit *la même race d'A. maculipennis*. Nous voulons simplement rapporter cette observation qu'en Vendée, comme en Algérie, nous avons toujours trouvé un grand nombre d'*Anopheles dans les maisons* non protégées par les toiles métalliques, tandis qu'aux environs de Paris, nous avons toujours trouvé peu d'*Anopheles* dans les maisons les plus proches des étangs où pullulaient les larves d'*Anopheles*. C'est ainsi que nous avons trouvé très peu d'adultes, durant des recherches faites deux années de suite, dans la maison de la Conservation du Bois de Boulogne, à une centaine de mètres d'un étang très infesté. De même nous n'avons jamais trouvé d'*Anopheles* adultes dans les baraquements où sont logés des soldats, à quelques mètres de l'étang de Chalais, qui est très infestés de larves aussi. Il semble donc que les *A. maculipennis*, presque domestiqués en Algérie et en Vendée, recherchent moins l'homme dans les environs de Paris.

D'autre part, la Vendée jouit d'un climat beaucoup plus doux que celui du bassin de la Seine; on y voit des figuiers, des palmiers en pleine terre. Or, on sait, depuis les travaux de Koch et de Grassi, que les hémamibes ne peuvent évoluer

1. F. Schaudinn. Studieo uber Krankheitserregende Protozen. II) *Plasmodium Vivax* (Grassi und Feletti), der Erreger des Tertianfiebers beim Menschen. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsämte*, t. XIX, f. 2, 1902, p. 188.

2. Celli. *Congrès de Bruxelles* 1903. Hygiène, 7e section (hygiène coloniale) 2e question (prophylaxie de la malaria), p. 5.

3. Laveran. *Anopheles* et Paludisme. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, I, n° 8, 15 juin 1903, p. 320.

4. Stephens et Christophers, *Royal Society. Report to the Malaria Committee*, 1901.

James, Malaria in India. *Scientific memoirs by officers of the medical and sanitary depertments of the government of India*, nouvelles séries, n° 2, 1902.

5. F. Loeffler, Die Malaria Krankheiten. *Die deutsche Klinik*, 1903. p. 679.

dans le corps du moustique qu'au-dessus d'une certaine température[1].

Les autres moustiques adultes que nous avons capturés sont *Culex pipiens*, que l'on ne trouve que dans le bourg ou les maisons bourgeoises, et jamais chez les paysans. Cela tient sans doute à ce que ceux-ci n'ont pas de lieux d'aisances, gîte habituel des larves de *C. pipiens*. Nous avons trouvé aussi *Theobaldia annulata* Meigen (*Culex annulatus*), et d'énormes *Theobaldia spathipalpis* Rondani (*Culex spathipalpis*).

Les moustiques, représentés surtout par les *Anopheles maculipennis*, sont la cause d'une gêne extrême pour les paysans, qu'ils assaillent par milliers durant les chaudes nuits d'été. Aussi fait-on, tous les soirs, la hibronnée (ou guibronnée, de hibron, ou guibron, nom sous lequel on désigne le moustique en Vendée). La hibronnée consiste à enfumer les maisons avec du foin humide ou des herbes aromatiques.

* * *

Le paludisme, dans la région de Saint-Philbert, comme dans toute la Vendée, a beaucoup diminué d'intensité depuis 25 ans. En dehors de toutes les formes intermittentes, il y avait de nombreux accès pernicieux, des cachexies graves avec grosses rates. Depuis une dizaine d'années, le paludisme est devenu beaucoup moins fréquent. (Observations des Drs Cailleteau, de Saint-Philbert ; Voyer, de Machecoul ; Guiberteau, de Saint-Jean-de-Corcoué.) Un ancien pharmacien de Saint-Philbert, M. Verger, déclare qu'autrefois, de 1872 à 1884 ou 1885, il vendait par an 4 ou 5 kilos de quinine ; il faut ajouter à cela que nombre de familles achetaient à Nantes la quinine en gros, par flacons de 30 grammes. Dans les dernières années, le même pharmacien, encore seul à Saint-Philbert, ne vendait plus que 3 kilos, ou même 2 kilos par an. Il faut remarquer que cependant la quinine a diminué de prix à la même époque. Il est donc bien certain que le paludisme diminue progressivement de fréquence dans cette région. Il paraît aussi bien certain que cet assainissement ne coïncide pas avec la disparition des *Anopheles* : ils sont aussi nombreux que dans les localités les plus palu-

1. Koch, Erster Bericht über die Thatigkeit der Malaria expedition. *Deutsche medic. Wochenschr.*, t. XXV, n° 37, 14 sept. 99, p. 601-604. Schoo a cependant vu l'hémamibe du paludisme évoluer chez des *Anopheles* à la température de 10° à 15°. (*La Malaria in Olanda*, Roma, 1902.)

déennes d'Algérie que nous ayons vues; et, d'autre part, les paysans, qui ne sont tourmentés que par des *Anopheles maculipennis*, et point par des *Culex*, sont loin de constater que le nombre des moustiques ait diminué depuis 20 ans.

Si le paludisme diminue de fréquence, les cas que l'on observe sont encore souvent fort graves. Durant l'été 1903, le Dr Cailleteau a observé un accès pernicieux à forme cholérique, et il a pu nous montrer plusieurs malades atteints de cachexie, avec une anémie très accusée et des rates dépassant de plusieurs travers de doigt le rebord des fausses côtes.

Le paludisme apparaît à Saint-Philbert au printemps, ce sont des cas rares et fort légers; puis, il y a un temps d'arrêt, et la véritable épidémie éclate au mois de septembre et d'octobre, quelquefois au mois d'août. Les cas de première invasion affectent très souvent une forme particulière; le malade présente une fièvre continue, en plateau, sans la moindre rémission, pendant plusieurs jours, jusqu'à une semaine; puis, qu'on donne de la quinine ou qu'on n'en donne pas, la fièvre revêt un type intermittent, le plus souvent la forme tierce. Il y a aussi des fièvres quotidiennes. Les cas de fièvre quarte sont moins communs et se voient surtout en automne. Enfin, on voit encore assez souvent la cachexie paludéenne, que les gens du pays appellent « la fièvre minante »; les accès pernicieux sont devenus rares.

Aucune statistique n'existe du paludisme dans ces campagnes, et, d'ailleurs, elle serait presque impossible à établir, car les paysans qui ont déjà eu la fièvre des marais et sont en présence d'une rechute, la reconnaissent fort bien, et se soignent seuls, par la quinine et les amers, sans demander le médecin. Aussi celui-ci n'est-il guère appelé que pour les cas de première invasion, à allure inquiétante. Il ne faut donc pas supposer le paludisme réduit aux cas diagnostiqués par les médecins. C'est ainsi qu'en 1903, les deux médecins de Saint-Philbert, les Drs Cailleteau et Guillou, dont la circonscription englobe 9,000 à 10,000 habitants, ont bien voulu noter en détail tous les cas de paludisme qu'ils rencontraient; ils en virent une cinquantaine seulement.

***

Les Drs Cailleteau et Guillou ont bien voulu nous apporter le concours de leur connaissance exacte de la nosographie du pays, et aussi de leur autorité naturelle sur les habitants, et c'est grâce à leur collaboration étroite que nous avons pu accomplir l'expérience que nous allons relater. Nous sommes heureux de leur adresser ici tous nos remerciements.

Nous avons choisi deux groupes de villages à défendre, l'un situé sur la côte est du lac, l'autre sur la côte sud-ouest. Sur la côte est, les villages étaient ceux de l'Aubrais, de l'Arsangle, de l'Héronnière, de la Bourrionnière et de la Haie. Ils sont tous distants les uns des autres, et du bord du lac, de moins d'un kilomètre à vol d'oiseau, et ils sont à environ un kilomètre des villages non défendus les plus rapprochés. Ils sont bâtis sur le sol alluvionnaire, au niveau, à peu près, des eaux du lac, et sont tous environnés de fossés, mares, trous d'eau, où foisonnent en été les larves d'*A. maculipennis*.

Le deuxième groupe de villages a été choisi sur l'autre rive du lac, à 6 kilomètres, à vol d'oiseau, du groupe précédent. Il comprend la Favrie, et la Vinette, qui se touchent. Ces deux villages sont bâtis sur les coteaux qui séparent le lac du Marais vendéen, ce qui fait que les collections d'eau y sont moins abondantes que dans les parties basses du pays; celles qui existent sont dues à l'imperméabilité des gneiss du sous-sol, qui fait des ruelles de ces villages, à la moindre pluie, un véritable bourbier.

L'Aubrais compte 4 feux, 23 habitants, dont 8 ont eu les fièvres, il n'y a pas très longtemps. Le nommé G. H., en particulier, a eu, il y a 6 ans, plusieurs accès pernicieux d'une gravité extrême. L'Héronnière comprend 3 feux (1 maison de maître, et 2 familles de paysans), 16 habitants dont 5 ont eu les fièvres. L'Arsangle comprend 3 feux (1 maison de maître où demeurent, l'été seulement, des Nantais, et 2 familles de paysans), 24 habitants, dont 4 ont eu les fièvres. La Bourionnière compte 2 feux, 18 habitants parmi lesquels nous ne relevons qu'un ancien fiévreux. A la Haie, une seule famille, 16 *habitants, dont* 10 *anciens fiévreux*. Les 6 personnes considérées comme indemnes sont : 1 femme de 31 ans et 1 vieillard de 70 ans, qui ont eu les fièvres des marais il y a très longtemps, mais sont

complètement guéris, puis G. C., domestique, 1 jeune homme de 24 ans, étranger au pays, revenant du service militaire cette année même, enfin 3 enfants de 4 ans, 18 mois, et 8 mois.

La Favrie compte 12 familles, 41 habitants, dont 9 seulement sont des anciens fiévreux. A la Vinette, 3 feux, 12 habitants, dont 4 anciens fiévreux.

Notre expérience comportait donc la défense de 153 personnes par la méthode de Koch. Il fallait d'abord examiner leur sang, pour déceler les anciens malades que l'hémamibe de Laveran infectait encore, et qu'il fallait traiter. Nous n'avons pas rencontré de difficultés sérieuses pour ces prises de sang, grâce à l'appui des D[rs] Cailleteau et Guillou, qui nous ont guidés partout. Nous avons pu, au commencement de juillet, piquer tout le monde, jusqu'à des enfants de 2 mois. Nous faisions la piqûre à la face dorsale de la phalangine du pouce, et nous n'étalions pas la goutte de sang. Nous lavions l'hémoglobine avec la solution indiquée par Ruge :

Formol..............................	2 c. c.
Acide acétique........................	0,5
Éau distillée..........................	100

qui a l'avantage d'enlever l'hémoglobine par l'acide acétique, tout en fixant les éléments cellulaires par le formol. Nous colorions ensuite par le procédé de Laveran. Sur aucune lame nous n'avons vu de parasites du paludisme. La sûreté de la méthode n'est pas en cause, car nous avons obtenu, en procédant de la même façon, des préparations très démonstratives avec le sang de paludéens en plein accès, provenant de Saint-Philbert (D[r] Cailleteau) ou de Machecoul (obligeamment envoyé par le D[r] Voyer). Nous croyons que l'on peut considérer que les parasites sont très rares dans le sang périphérique, en dehors des états fébriles, chez nos populations plus ou moins habituées à l'usage de la quinine. Cette rareté des hémamibes dans le sang, au cours du paludisme latent, et aussi, parfois, au cours de manifestations fébriles, a même conduit Stephens et Christophers et Rogers [1] à chercher dans l'augmentation du nombre des

1. J. W.-W. Stephens et S.-R. Christophers, The malarial and blackwater Fevers of British Central Africa. *Rep. to the Malaria Committee of Roy. Soc.* 3e série, 6 juillet 1900, p 12.

L. Rogers, The diagnostic value of the variations in the leucocytes and other

grands mononucléaires un signe de paludisme récent, comme moyen auxiliaire de diagnostic microscopique. Nous avons fait la numération des leucocytes de nos 153 sujets, en pointant le nom de ceux dont les grands mononucléaires dépassaient le pourcentage de 20 0/0. Malheureusement, le sang des enfants, qui est le plus intéressant à étudier au point de vue du paludisme, a normalement plus de grands mononucléaires que celui des adultes.

La numération de cette sorte de leucocytes ne pouvait donc pas nous servir pour le diagnostic chez les enfants. Nous nous sommes, par suite, surtout basés sur les données cliniques, considérant comme pouvant devenir dangereuses toutes les personnes ayant eu, depuis peu d'années, des accès de paludisme. Ce sont celles que nous avons signalées, elles sont au nombre de 41.

Nous avions fait préparer des cachets de 1 gramme de sulfate de quinine[1] (marque Adrian), que nous voulions faire prendre à ces 41 personnes 2 jours de suite, à 10 et 11 jours d'intervalle. Nous avions conseillé de prendre ces cachets aux repas du soir, pour que les bourdonnements d'oreille ne fussent pas aussi gênants[2]. Malgré cette précaution, et la bonne volonté évidente des paysans en expérience, presque tous nos sujets étaient en proie, après l'absorption de 1 gramme de sulfate de quinine, à une véritable ivresse quinique, qui les rendait malades 3 et 4 jours. Ce malaise survenant au moment des plus forts travaux agricoles leur faisait refuser la quinine. Les rudes ouvriers que sont les paysans de ces pays, hommes et femmes, ne pouvaient se faire à l'idée qu'un remède, pris pour une maladie qu'ils n'avaient pas encore, les empêchait de travailler, ne fût-ce que quelques heures. Du mois de juillet au mois d'octobre, la moisson (qu'ils font en deux fois : l'épi d'abord, le chaume ensuite), la fenaison, la vendange, les font se lever avant l'aurore et se coucher bien après le coucher du soleil. Or, les

blood changes in Typhoïd and Malarial Remittent Fevers respectively. *Brit. Med. Journ.*, 5 avril 1902, n° 2513, p. 827.

L. Rogers, The differentiation of the continued and remittent fevers of the tropics by the blood changes. *Lancet*, t. CXIV, 30 mai 1903, p. 1500-1508.

1. Nous n'avons pas employé l'euquinine : 1° à cause de son prix trop élevé 2° parce que son action thérapeutique ne nous est pas encore assez démontrée, et nous n'avons pas voulu accumuler les inconnues dans notre expérience.

2. Voir B. Gosio, Die Bekämpfung der Malaria in der Maremma Toscana. *Zeitschr. fur Hyg. u. Infekt.*, t. XLIII, n° 1, 1903, p. 163.

médecins ont dû constater que parfois l'incapacité de travail durait 2 et 3 jours. C'est même là un fait curieux que nous n'avons pas observé souvent en Algérie. Nous avons trouvé deux cas d'intolérance extrême, aux doses les plus faibles, chez 2 femmes de la Favrie, mais nous n'avons pas relevé un seul accident sérieux.

En face de cette impossibilité complète d'appliquer dans son entier la méthode de Koch, nous avons dû fractionner le gramme de sulfate de quinine en 3 cachets de 33 centigrammes chacun, que les personnes en expériences ont pris en 3 jours tous les 10 jours, du 23 juillet au 20 octobre. (Les enfants qui ne pouvaient pas avaler les cachets délayaient la quinine dans un peu d'eau.) La grande loyauté des populations de ces contrées nous a facilité l'administration de ces cachets 3 jours consécutifs, et les Drs Cailleteau et Guillou, qui ont procédé le plus souvent à la distribution de la quinine, ont pu vérifier qu'elle a toujours été bien prise.

L'objection que peut soulever notre expérience, et qui vient immédiatement à l'esprit, est celle-ci : nous n'avons pas appliqué complètement la méthode de Koch qui donne 1 gramme de quinine 2 jours de suite tous les 10 et 11 jours. Nous pourrions répondre que jamais les sujets en expérience n'auraient consenti, malgré tous les conseils de leurs médecins, à se rendre réellement malades pour éviter un péril incertain, et c'est là un vice primordial de la méthode, mais les événements donnent eux-mêmes réponse à l'objection : parmi toutes les personnes soumises au traitement, 2 petites filles seulement, de 7 et de 8 ans, ont eu des rechutes, bien qu'elles prissent les mêmes doses que les adultes, c'est-à-dire 33 centigrammes 3 jours consécutifs, à 10 jours d'intervalles. Or, 33 centigrammes pour un enfant de 7 ans correspond à 1 gramme pour un adulte [1]. *Les seuls sujets qui ont présenté des rechutes sont donc ceux là même qui ont été soumis à la méthode de Koch rigoureusement appliquée.*

Ces deux petites filles sont du village de la Haie : G. Louise, 7 ans, et G. Madeleine, 8 ans. Elles ont eu leur rechute au même moment, l'une le 16 septembre et l'autre quelques jours

1. D'après le tableau dressé par Gaubius et adopté par tous les ouvrages classiques, un enfant de 7 à 14 ans reçoit le tiers de la dose prescrite à un adulte. (*Formulaire* de A. Gilbert et P. Yvon, 12e édition, Paris, p. 8.)

après, le traitement par la quinine étant commencé depuis le 23 juillet. Au commencement de juillet, nous n'avions pas trouvé d'hémamibes dans le sang de ces deux enfants ; cependant, comme elles avaient eu les fièvres en 1901 et en 1902, nous les avions soumises au traitement quinique. Dans cette ferme, d'ailleurs, la plupart des habitants sont profondément cachectisés, le père, G. François, spécialement (fièvre minante des gens du pays). Comme nous l'avons dit, sur 16 personnes, 6 seulement étaient indemnes en juillet 1903 : 1 femme et 1 vieillard qui avaient eu les fièvres étant très jeunes, un nouveau venu, et 3 petits enfants. Les accès quotidiens des 2 petites filles, très nets, retardant l'un sur l'autre, avec apyrexie vespérale, furent accompagnés d'une augmentation de volume de la rate considérable, constatée à la percussion et à la palpation (deux travers de doigt au-dessous du rebord des fausses côtes). Ils cédèrent, au bout de 5 à 6 jours, à une médication quinique énergique. Mais, *en fin septembre*, 2 des habitants indemnes *de la même maison*, ou plutôt, de la même chambre, G. Joseph, 21 mois, et G. Célestin, 24 ans, eurent des accès paludéens. G. Joseph eut 3 accès, G. Célestin fut malade plusieurs jours; leurs accès revenaient suivant le type de la fièvre quotidienne. Ils furent traités, bien entendu, dès les premiers symptômes. Nous devons faire observer que le genre de vie de ces deux malades exclut tout à fait pour eux la possibilité de s'être infectés ailleurs que dans le village de la Haie. Au moment surtout des forts travaux agricoles, les paysans ne quittent leurs villages que pour aller, le dimanche matin, à la messe au bourg. La semaine, leur travail actif les tient en mouvement toute la journée dans leurs champs, et, le soir venu, harassés de fatigue. ils ne songent qu'à regagner leur demeure pour prendre un repos bien gagné.

D'ailleurs, l'enfant de 21 mois n'a pas quitté la maison, qui constitue à elle seule le village de la Haie.

Enfin, vers le 20 octobre 1903, une jeune dame, Mme J., 23 ans, qui venait, depuis 2 ans, passer l'été à l'Arsangle, sans contracter le paludisme, présenta 3 accès quotidiens. A la même époque, la nièce de cette dame, G. du M. Y., 16 mois, qui avait passé l'été 1902 à l'Arsangle sans maladie, eut aussi des accès de paludisme diagnostiqués par le Dr Cailleteau. Ces

deux personnes, en dehors de leur séjour à l'Arsangle ne sont allées qu'à Nantes et à Rezé (près de Nantes).

Nous ne pouvons pas déterminer d'une manière précise comment ces deux dernières personnes ont contracté le paludisme. L'Arsangle est à environ 1 kilomètre à vol d'oiseau de la Haie. Il est possible que les *Anopheles* se soient infectés à l'Arsangle même, en piquant un paludéen dont l'accès est passé inaperçu. Mais l'avis du médecin traitant, M. le Dr Cailleteau, est que ces deux personnes ont été infectées au cours d'un de leurs voyages à Nantes ou à Rezé.

Nous avons observé un bon résultat de la médication quinique chez deux femmes du village de la Vinette : S. Léonie, 48 ans, et C. Séraphine, 53 ans, anciennes paludéennes et sujettes à des névralgies fréquentes, qui n'étaient pas d'origine dentaire. Nous avions soupçonné des manifestations larvées de paludisme. Quoi qu'il en soit, le traitement quinique leur a procuré un réel soulagement, et elles réclamaient le médicament.

*
* *

L'expérience de prophylaxie du paludisme, basée exclusivement sur la méthode de Koch, que nous avons faite à Saint-Philbert-de-Grand-Lieu, ne nous a donc pas donné de bons résultats. Les reproches qu'on peut faire à cette méthode seront, dans notre cas particulier :

1° Le diagnostic microscopique du paludisme latent n'est pas possible chez des populations comme celles auxquelles nous avions affaire, toujours plus ou moins quininisées. La preuve de l'insuffisance de l'examen microscopique est fournie par ce fait que les deux petites filles : G. Louise et G. Madeleine, qui ont eu des rechutes vers le 15 septembre, n'ont pas montré d'hémamibes dans leur sang au commencement de juillet, à la veille du commencement de la campagne;

2° Chez des ouvriers agricoles, comme le sont la plupart des personnes à défendre contre le paludisme, il est impossible (du moins pour ce qui regarde les Vendéens, à qui nous avions affaire) d'administrer les doses de quinine prescrites par Koch. L'ivresse quinique, qui leur cause une réelle incapacité de travail, leur fait refuser des doses aussi fortes;

3° Le traitement quinique, commencé avant la période épi-

démique (qui est fort courte en Vendée, comme on le peut voir d'après ce que nous avons dit), n'a pas empêché deux anciennes paludéennes de rechuter. *Il faut remarquer que ces deux petites filles ont pris exactement les doses indiquées par Koch.*

4° Comme conséquence de ces deux rechutes, deux cas de paludisme de première invasion ont éclaté chez des personnes habitant avec ces deux petites filles.

Deux autres cas de première invasion ne se lient point de façon évidente à des rechutes constatées dans le voisinage immédiat, et peuvent s'expliquer par une inoculation survenue ailleurs que dans les villages défendus, étant donné le genre de vie des deux malades (une jeune dame et un bébé de 16 mois faisant des voyages dans d'autres régions réputées palustres).

Si nous comparons ces résultats peu encourageants avec ceux que nous avons obtenus, en Algérie, par la défense mécanique et le pétrolage des gîtes à larves d'*Anophelinæ*, nous n'hésitons pas à conclure en faveur de la supériorité évidente de ces derniers modes de défense.

Le principe théorique de la désinfection du sang des fiévreux est très logique, et, s'il était applicable, il permettrait d'arrêter la renaissance annuelle des épidémies paludéennes. Malheureusement, en pratique, la quinine, qui est le meilleur spécifique du paludisme, n'empêche cependant pas toujours les rechutes de se produire. La cure quinique des anciens paludéens est évidemment indiquée, dans l'intérêt général aussi bien que dans l'intérêt particulier, et constituera un des éléments de la prophylaxie du paludisme ; elle ne peut pas, à notre avis, en constituer la base, à l'exclusion des autres méthodes. Elle sera un bon adjuvant, mais c'est de la lutte contre les moustiques que nous devons attendre les résultats les plus satisfaisants.

Campagne antipaludique en Algérie

(1903.)

PAR LES Drs EDMOND ET ETIENNE SERGENT,

DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

A la suite de notre première expérience, durant l'été de 1902, à la gare de l'Alma [1], sur la prophylaxie des fièvres paludéennes au moyen de mesures de défense contre les *Anopheles*, la Compagnie des chemins de fer de l'Est-Algérien a décidé d'étendre en 1903 ces mesures de défense à plusieurs autres gares fiévreuses de son réseau, et, d'accord avec l'Institut Pasteur de Paris, a chargé l'un de nous de mettre en œuvre ces mesures prophylactiques et d'exercer une surveillance médicale (au point de vue du paludisme) sur les personnes protégées habitant ces gares.

Parmi les gares particulièrement palustres indiquées par les renseignements très compétents du médecin en chef de la Compagnie, M. le docteur Stéphann, que nous sommes heureux de remercier ici de sa cordiale amitié, nous avons choisi celles qui nous paraissaient les plus atteintes par le paludisme et, autant que possible, celles qui se trouvent éloignées des centres habités, de façon à ce que les mesures prises fussent plus efficaces. Nous avons choisi 6 gares : Mirabeau, Thiers, Aomar-

1. Nous avions voulu, par notre expérience de l'Alma, répondre à la question suivante : « Est-il possible, dans les conditions pratiques où l'on se trouve en Algérie, d'y défendre contre les *Anopheles*, inoculateurs du paludisme, un groupement d'Européens ? » Les mesures prises ayant abaissé d'une façon extrêmement marquée le nombre des moustiques capturés à l'intérieur des habitations, empêché l'éclosion de nouveaux cas de paludisme, et diminué les rechutes des anciens infectés, nous avons conclu que les deux méthodes associées : protection mécanique contre les *Anopheles* adultes, et destruction de leurs larves, étaient applicables en Algérie. Nous avons voulu alors vulgariser ces notions en Algérie ; M. Jeanmaire, recteur de l'Académie d'Alger, a bien voulu publier et envoyer à tous les instituteurs d'Algérie, un mémoire où nous exposions l'intérêt des découvertes récentes et la prophylaxie nouvelle qui en découle. (*La lutte contre le paludisme, d'après les travaux récents.* Alger, typogr. Jourdan, mars 1903.)

ED. SERGENT et ET. SERGENT, Résumé du rapport sur la campagne antipaludique organisée en 1902 à la gare de l'Alma (Est-Algérien). *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, 26 janvier 1903, pp. 68-74. — E. SERGENT, *La lutte contre les moustiques. Une campagne antipaludique en Algérie.* Paris, 1903.

Dra-el-Mizan, Ighzer-Amokran, Takrits-Seddouk, Ouled-Rahmoun. En outre, la campagne commencée en 1902 à l'Alma fut continuée en 1903. Deux des gares défendues sont à proximité de villages : Thiers et Mirabeau. Toutes les autres sont distantes de plusieurs kilomètres de toute agglomération. Ces 7 gares

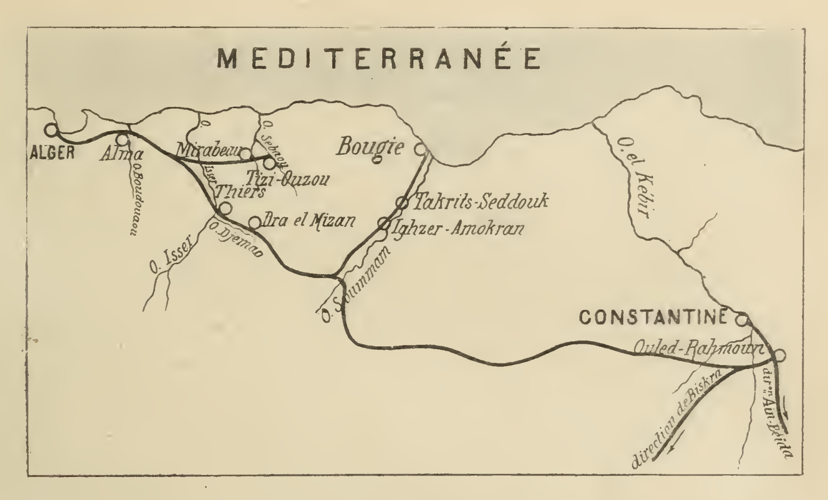


Fig. 1.
Gares défendues de l'Est-Algérien.

sont éparses sur le réseau, à de grandes distances les unes des autres, une dans la plaine de la Mitidja, 5 dans les vallées de la Kabylie, une sur les Hauts-Plateaux. (Fig. 1.)

Toutes les gares choisies ont des antécédents paludiques très chargés : d'après les renseignements rétrospectifs que nous avons pu recueillir, les années précédentes, ont éclaté 79,3 0/0 de cas de première invasion, dont 2 suivis de mort, dès le premier été de séjour, chez 81 personnes nouvelles venues. En 1902, année qui ne fut pas particulièrement fiévreuse, il y eut 35,2 0/0 cas de première invasion (chez 34 indemnes ou sensibles) et 93,4 0/0 rechutes (chez 46 anciens infectés).

MESURES PRISES

1. *Destruction des larves d'Anopheles.* — Elle s'effectuait par projection de pétrole, à intervalles variant de 15 à 30 jours, selon les cas, sur les mares et canaux voisins des gares, gîtes à

larves d'*Anopheles* soumis préalablement à un examen minutieux. Ces pétrolages étaient exécutés à l'aide d'une pompe de jardin, à air comprimé, par des agents des gares sous notre surveillance. Nous employions le pétrole qui sert à l'éclairage des lampes de la Compagnie (Fig. 2).



Fig. 2.
Pétrolage d'une mare à larves d'*Anopheles* dans le lit de l'Oued Djemaa, près de la gare d'Aomar-Dra-el-Mizan.

2. *Défense mécanique des habitations.* — Des cadres de bois, tendus de toile mécanique, en fil de fer galvanisé, furent appliqués à toutes les ouvertures des gares. Les cadres doublant les portes sont mobiles comme celles-ci, à l'aide de charnières. Aux fenêtres, les cadres sont immobiles, et la toile métallique est percée d'une lucarne pour permettre de tirer les volets. Aux fenêtres des chambres du premier étage, les lucarnes sont plus grandes qu'aux fenêtres du rez-de-chaussée, et on peut y passer la moitié du corps pour surveiller les alentours.

3. A chaque visite de l'un de nous, durant l'été (total de 65 visites) tous les habitants des gares étaient examinés au point de vue du paludisme ; pour les cas suspects, on pratiquait sur-le-champ un examen clinique approfondi, et l'examen microscopique du sang. C'est ainsi que l'on put déceler la véritable cause de plusieurs « fièvres » ou « malaises » attribués par les sujets au paludisme, et qui avaient en réalité d'autres causes : accès de fièvre d'origine dentaire chez les enfants ; embarras gastriques ; insolation ; dans un cas, troubles de la santé liés à la présence dans le sang, durant le jour seulement, d'un protozoaire nouveau, de forme très allongée et à grand noyau central [1]. Par contre, l'examen microscopique du sang nous permit de déceler chez un enfant (enfant du poseur M..., aux Ouled-Rahmoun), l'origine palustre de ses accès de fièvre continus qui, au début de la maladie, vu l'absence de certains symptômes (splénomégalie) et la présence d'un symptôme important (diarrhée jaune) nous faisaient hésiter à porter un diagnostic ferme. Des préparations du sang de cet enfant examinées le jour même, nous montrèrent un très grand nombre de petites et grandes formes de schizontes.

GARE DE L'ALMA

La campagne antipaludique dans cette gare en 1903, n'est que la continuation de la campagne qui y fut organisé en 1902.

Agents protégés :	indemnes	ayant séjourné plus de 3 mois.......	4
—	—	— de 8 jours à 2 mois...	2
—	infectés	ayant séjourné plus de 3 mois.........	10
—	—	— de 8 jours à 2 mois.....	2

MESURES PRISES

1° *Destruction des larves d'Anopheles.* — Les gîtes des larves d'*Anopheles* furent les mêmes qu'en 1902, canal d'irrigation à l'ouest : quelques flaques d'eau dans le lit de l'oued Boudouaou à l'est, et bords mêmes de l'oued.

Il y eut en général bien moins de larves que l'été dernier ; les pétrolages furent commencés plus tôt. En 1902, les premiers pétrolages eurent lieu en juin (26 juin) ; en 1903, le 18 mai. On fit faucher les herbes encombrant le canal le 16 mai, comme il avait été fait en

1. Ed. et Et. Sergent. Sur un nouveau protozaire, parasite ectoglobulaire du sang de l'homme. *Soc. de Biologie*, t. LV, p. 1163, 17 octobre 1903.

1902, pour faciliter l'étalement du pétrole. Nous n'avons plus fait faucher ces plantes le reste de l'été 1903 ; car, 15 jours après le premier fauchage, elles avaient déjà recouvert la surface de l'eau. Nous avons voulu voir si, dans les conditions naturelles où nous nous trouvions cette année, nous pouvions éviter cette besogne si pénible. et qui d'autre part, dans certains marécages, est impossible. Nous nous étions munis cette année d'une petite pompe à air comprimé pour projeter le pétrole à grande distance. Cette pompe, introduite dans le bidon à pétrole, manœuvrée par l'homme d'équipe que nous employions à cette opération, pouvait projeter dans toutes les directions, et à la distance de 5 à 6 mètres, un jet de pétrole ; de cette façon. on en pouvait projeter au milieu des herbes, partout où il y avait de l'eau, et l'opération se faisait complètement et facilement. Nous avons remarqué de plus que les *Anopheles* vivaient surtout dans les clairières de ces buissons herbeux, qu'ils étaient toujours rares sous les touffes obscures des plantes. Cette remarque a été faite plus d'une fois que les larves d'*Anopheles* aiment la lumière.

Dans le lit de l'oued Boudouaou, les mares laissées par l'oued furent plus abondantes et plus résistantes que l'été dernier. Elles donnèrent asile, fin juin, à de nombreuses larves ; à la suite de pétrolages répétés, il n'y en eut plus pendant l'été. Les bords de l'oued, dont le courant est insignifiant, présentèrent quelques larves cachées derrière des plantes, des mousses.

Le canal fut pétrolé sur une longueur de 400 à 500 mètres. En octobre, le canal se dessécha en amont du ponceau de la voie. En aval des flaques d'eau isolées donnaient asile à de nombreuses larves de *C. pipiens*.

2° *Défense mécanique des habitations.* — Les grillages placés en juin 1902 purent servir encore pendant l'été 1903. En automne 1903. les grillages de la porte de la maison nette de la garde-barrière présentèrent de grands trous. La précaution de les retirer à l'abri, l'hiver précédent, avait été omise, de sorte que le fil de fer, quoique galvanisé, avait été rouillé et devenait moins solide. Les autres grillages ont résisté. Le buffetier, dont la chambre à coucher avait été munie de grillages, s'est toujours félicité de ces mesures contre les moustiques, mais il n'a pu se résoudre à fermer la porte grillagée de la cuisine où couchait sa domestique, disant que cette porte gênait quand on faisait du feu dans la cuisine. Cette pièce, petite, noire, basse de plafond, n'a pas la disposition des cuisines des agents de la Compagnie ; ordinairement la cuisine se trouve dans le même corps de bâtiment que les autres chambres, de sorte qu'il n'est pas nécessaire de placer un cadre de toile métallique sur sa porte, le cadre grillagé placé à la porte d'entrée suffit. Au contraire, chez le buffetier, la cuisine constitue un bâti-

ment séparé. D'ailleurs, nous n'y recueillîmes aucun *Anopheles;* les pétrolages pratiqués au voisinage avaient fait leur effet.

RÉSULTATS

1° *Dus aux pétrolages.* — Les pétrolages pratiqués pendant l'été 1902 eurent leur effet encore en 1903. Nous trouvâmes beaucoup moins de larves d'*Anopheles* dans les gîtes, que l'année 1902.

2° *Résultats dus à la défense mécanique.* — Dans les appartements protégés, nous ne trouvâmes en tout que 3 *Anopheles* pendant tout l'été.

3° *Résultats sur la santé du personnel en expérience.* — 5 personnes indemnes ont passé tout l'été sans symptômes de paludisme (4 avaient été protégées en 1902).

1 personne (un enfant, le fils du chef de gare) y a passé environ 1 mois, en juillet, et 8 jours en septembre sans être malade [1].

Durant le même été de 1903, le docteur Pidoucet, de l'Alma, a observé au village de l'Alma plusieurs cas de première invasion, qu'il a bien voulu nous signaler. Le village est infesté par des *Anopheles* qui ont d'autres gîtes que ceux de la gare.

8 personnes anciennes infectées, ayant toutes eu des rechutes en 1902, ne présentèrent aucune manifestation paludique en 1903. Seuls le chef de gare et sa femme, impaludés tous deux depuis plusieurs années, eurent des manifestations larvées, bénignes, en automne (malaise, frisson, légère fatigue seulement).

2 personnes anciennes infectées passèrent, l'une 10 jours, l'autre 1 mois sans rechute.

GARE DE THIERS.

Situation : au fond de la vallée de l'oued Isser, à 4 ou 5 mètres au-dessus du village de Thiers qui la sépare de l'oued.

Altitude comparée de l'oued et de la gare : 8 mètres.

Eau potable : fontaine près de la gare (même eau que le village, eau assez bonne). Fontaine du brigadier, analogue.

Altitude au-dessus de la mer : 189,40.

Distance d'Alger : 88 kilomètres.

Bâtiments de la Compagnie : 1° gare : rez-de-chaussée, bureau; premier étage, appartement du chef de gare; 2° en face, de l'autre côté de la voie, maisonnette de l'homme d'équipe ; 3° à 300 mètres au N.-O., maisonnette du brigadier.

1. La présence de cet enfant à la gare de l'Alma, en été 1903, est une preuve de la confiance qu'a inspirée au chef de gare notre expérience de 1902. Jamais il n'avait gardé son fils près de lui en été, de peur des fièvres ; il n'a pas craint de le faire cette année.

Habitations voisines : A 3 ou 4 mètres plus bas et 150 mètres de distance, les premières maisons du village.

Puits voisins : Puits abandonné à 300 mètres près de la voie au S.-E.

Végétation : Bois d'eucalyptus entre le village et la gare.

Gîtes à Anopheles : 1°. Petite source à faible débit à 2 mètres du

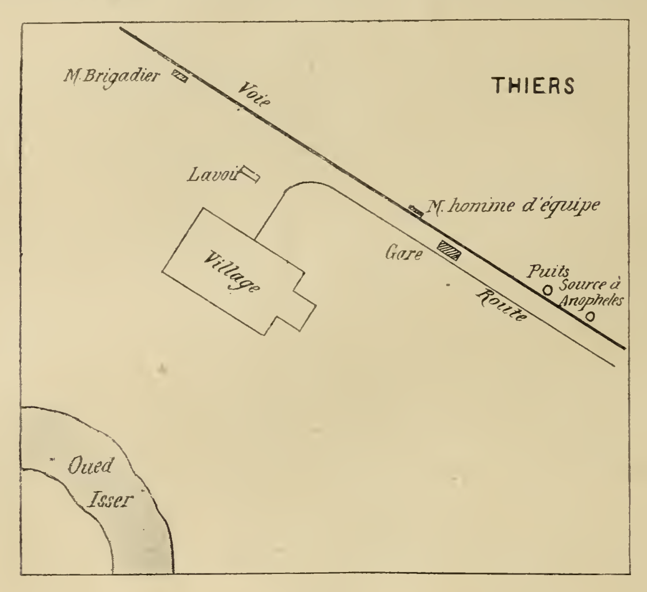


Fig. 3.
Gare et village de Thiers.

puits abandonné, au S.-E. Eau stagnante sur une longueur de 2 ou 3 mètres, une largeur de 50 centimètres. Cette source, nous disent les anciens agents de la gare, persiste tout l'été. En avril, nombreuses larves d'*Anopheles Algeriensis*. Elle sécha dès les premiers jours de juillet,

2° A l'est du village, en contre-bas du lavoir public, mal entretenu, réservoir à eau croupissante, mousses vertes. Larves d'*Anopheles Algeriensis* en juillet, septembre, novembre.

§ II. — Antécédents paludiques de cette gare.

Depuis 2 ans, sur 5 personnes indemnes ou sensibles habitant la gare, 1 contractait le paludisme. En 1902, sur 3 indemnes ou sensibles, personne n'était atteint. En somme, la gare de Thiers n'est pas très fiévreuse. Néanmoins, les habitants de la gare sont susceptibles d'y contracter les fièvres, puisqu'en 1901 une personne y tombait

malade (l'enfant du brigadier), assez gravement pour être hospitalisé à l'hôpital de Ménerville où il resta 25 jours, présentant pendant 7 jours une fièvre élevée, continue, puis 3 accès les jours suivants.

§ III. — Mesures prises.

1° *Destruction des larves d'Anopheles.* — Le 29 avril, premier pétrolage de la source de l'est.

Le 6 juillet, pétrolage.

Le gîte d'*Anopheles* trouvé près du village (réservoir en maçonnerie) n'est pas pétrolé ; il fournit des *Anopheles* surtout au village. En même temps que la source, on pétrole une citerne située dans la cave et qui fournit les *Culex* très nombreux dans les appartements.

2° *Défense mécanique des appartements.* — Le 14 août, les grillages sont placés à la gare. A la fin du mois d'août, ils ont été placés aux 2 maisons de l'homme d'équipe et du brigadier.

§ IV. — Résultats.

1° *Dus aux pétrolages.* — Les pétrolages de la source détruisirent un grand nombre de larves au printemps. L'été étant particulièrement sec, la source fut desséchée en juillet, ce qui évita de nouveaux pétrolages. Les pétrolages de la citerne de la cave firent bientôt disparaître les très nombreuses larves de *Culex* qui y pullulaient. Des myriades de *Culex* adultes achevaient d'hiverner, au printemps, sur les murs de la cave. Ils disparurent, bientôt après les pétrolages.

2° *Dus à la défense mécanique.* — Avant la pose de grillages, de très nombreux *Culex* étaient recueillis dans le bureau et les chambres du chef de gare.

Aucun ne put être recueilli après la pose.

Aucun *Anopheles* n'a pu être recueilli durant tout l'été.

3° *Résultats sur la santé du personnel en expérience :*

5 indemnes ou sensibles ayant séjourné plus de 3 mois... 0 cas.
1 — — — de 8 jours à 1 mois... 0 —
4 anciens infectés ayant séjourné plus de 3 mois......... 2 rechutes.

Au village voisin, tous les habitants sont infectés depuis longtemps, de sorte que le médecin de la localité n'a pas pu nous donner de statistiques comparatives pour les cas de première invasion.

GARE DE MIRABEAU

Situation : vallée du Bougdoura, affluent du Sébaou.

Altitude comparée de l'oued voisin et de la gare : à l'ouest, O. Bougdoura 5 à 6 m. Au nord, O. Sebaou, 5 m.

Distance de l'oued Bougdoura, 1 km. O. Sebaou; 1,500 m. environ.

Eau potable : puits près de la voie, à 50 m. de la gare, puits couvert; eau bonne, durant l'été 1903 les habitants du village, manquant d'eau, sont venus puiser à ce puits.

Altitude de la gare au-dessus de la mer : 48 m.

Distance d'Alger : 96 km.

Bâtiments des agents de la Cie :

1° Gare (appartement du chef de gare);

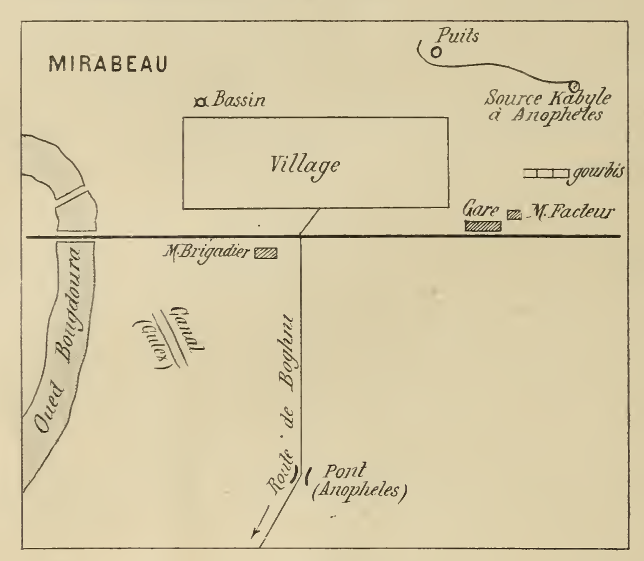


Fig. 4.
Gare et village de Mirabeau.

2° Maisonnette du facteur à 30 m. au nord;

3° Maisonnette du brigadier, 150 m. à l'ouest.

Habitations voisines : maison du chef de gare de la Cie du chemin de fer sur routes d'Algérie entre la gare de l'Est-Algérien et la maisonnette du brigadier (à 40 m. de la gare).

Les premières maisons du village sont à 150 m. à l'ouest.

A l'est, gourbis kabyles à 150 m.

Puits ou sources voisins : puits du village; source kabyle au N.-E, à 200 m.

Village voisin : Mirabeau, à 150 m.

Végétation : grands eucalyptus le long de la voie; céréales au sud.

Gites à Anopheles : 1° Au nord-est de la gare à 200 m., source kabyle qui sert à l'alimentation des Kabyles dont les gourbis se

trouvent à 150 m. de la gare. Le trop-plein de cette source s'écoule dans un petit fossé qui se dirige de l'est à l'ouest, sur une longueur de 100 à 200 m., jusque sur la partie nord du village. Ce fossé fut le réceptacle dans le mois de juin et le mois de juillet, de nombreuses larves d'*A. maculipennis*. Il se dessécha complètement dès le commencement du mois d'août.

2° Au sud, à 900 m. source très profonde, formant tout l'été des marécages très étendus des 2 côtés de la route de Boghni. Végétation luxuriante; grande abondance de larves d'*A. maculipennis*.

AGENTS DE LA COMPAGNIE PROTÉGÉS

Indemnes ou sensibles ayant séjourné plus de 3 mois en 1903, 8.

Anciens infectés ayant séjourné plus de 3 mois, 1.

— — — de 8 jours à 2 mois, 3.

§ II. — ANTÉCÉDENTS PALUDIQUES DE CETTE GARE.

Depuis 1 an (nous n'avons pas pu recueillir de renseignements sur les années précédentes), 6 personnes indemnes ou sensibles sont venues y habiter; 4 contractaient le paludisme le premier été de séjour.

§ III. — MESURES PRISES.

1° *Destruction des larves d'Anopheles*. — 6 juin, pétrolage du fossé de la source du N.-E. sur une longueur de 300 m. et de la source du pont de la route de Boghni.

27 juin, pétrolage.

20 juillet, pétrolage de la source de la route de Boghni, le fossé de la source N.-E est à sec; pas de larves dans la source elle-même.

20 août, pétrolage de la source sud.

22 septembre (larves de *C. fatigans* et d'*A. maculipennis* toujours présentes).

16 novembre, pas de larves;

2° *Défense mécanique des habitations*. — L'installation des grillages ne fut terminée que le 5 août :

A; au bureau du chef de gare.

B; aux chambres (1er étage) du chef de gare.

C; à la maisonnette du facteur.

D; à la maisonnette du brigadier.

A la maisonnette du facteur, l'installation des cadres métalliques a toujours laissé à désirer; les cadres des portes, mal scellés, sont tombés au bout d'un mois; replacés à nouveau, ils n'obturent pas parfaitement.

§ IV. — RÉSULTATS.

1° *Dus aux pétrolages*. – Les gîtes à *Anopheles* que nous avons

pétrolés (source N-E, source sud) étaient les seuls gîtes à *Anopheles* des alentours de la gare dans un périmètre de 900 m. de rayon. L'oued Bougdoura ne formait pas de mares à *Anopheles*. Or, dans ce périmètre est compris tout entier le village de Mirabeau qui a bénéficié ainsi de ces pétrolages. Cependant, des gîtes à *Culex* non pétrolés (vieux puits au nord du village; abreuvoir abandonné au nord) ont donné asile, au printemps et en automne, à des myriades de larves de *Culex*, qui en été ont infesté les habitations du village. Un homme d'équipe, travaillant le jour à la gare et ayant son domicile dans le village, déclarait être très incommodé la nuit par de nombreux moustiques.

2° *Résultats dus aux moyens mécaniques.* — Les agents ne se sont jamais plaints d'être dérangés par les moustiques. Avant la pose, le 6 juin, quelques *Culex* furent recueillis chez le chef de gare, le facteur; le 27 juin, 1 *Anopheles maculipennis* et 1 *Culex* chez le brigadier; en juillet quelques *Culex* chez le chef de gare, le facteur et chez le brigadier.

Pas un moustique ne fut recueilli après la pose des cadres grillagés.

3° *Résultats généraux sur la santé du personnel.* — Aucune des 8 personnes indemnes ou sensibles ayant passé l'été 1903 à la gare ne contracta le paludisme.

Les premiers jours de septembre, le jeune fils du facteur, âgé de 8 ans, présenta des symptômes d'insolation, avec fièvre élevée. Il fut envoyé à l'hôpital de Tizi-Ouzou, avec le diagnostic d'insolation. On lui administra de la quinine. Les symptômes, l'absence de rate, la marche de la maladie, et l'absence de rechutes après son départ de l'hôpital (son séjour y avait été de 8 jours) font écarter le diagnostic de paludisme. (Le traitement quinique ne fut pas continué après la sortie de l'hôpital.)

3 personnes anciennes infectées, qui séjournèrent de 8 jours à 2 mois en été 1903, n'eurent pas de rechutes, 1 personne ancienne infectée, qui y séjourna 3 mois d'été, n'eut pas de rechutes.

GARE D'AOMAR-DRA-EL-MIZAN

Situation : Au fond de la vallée de l'oued Djemaa, affluent de l'Isser. Vallée très encaissée. La voie, parallèle au cours de l'oued, suit le fond de la vallée (flanc nord).

Altitude comparée de l'oued et de la gare : 8 à 10 mètres.

Distance de l'oued : 150 mètres.

De plus, à 130 mètres à l'est, perpendiculairement à la voie, descend un torrent qui se dessèche complètement en été (oued Chaaba) sauf à la partie inférieure, dans le fond de la vallée (sous le pont de la voie).

Eau potable : grand puits datant de la construction de la gare et attenant à une prise d'eau.

Altitude de la gare au-dessus de la mer : 237m.41.

Distance d'Alger : 99 kilomètres.

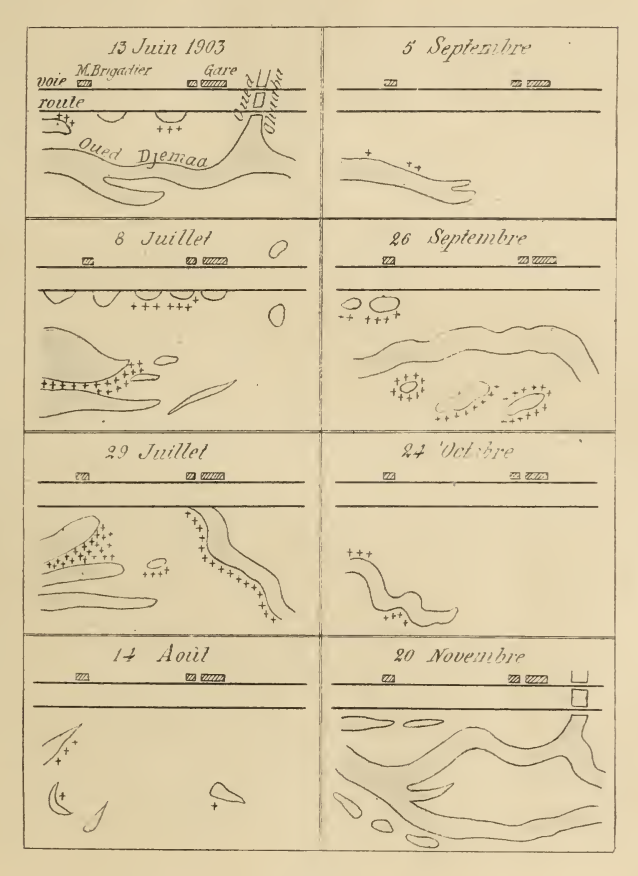


Fig. 5.
Gare d'Aomar-Dra-el-Mizan. — Mares de l'oued Djemaa. Les croix indiquent les gîtes à *Anopheles*.

Bâtiments des agents de la gare : 1° gare, 1 étage : appartements du chef de gare; 2° maisonnette du facteur à 30 mètres, rez-de-chaussée; 3° à 450 mètres à l'ouest, maisonnette du brigadier (passage à niveau de la route d'Aomar à Beni-Haroun); 4° côté sud de la voie, dépôt : 2 chambres (rez-de-chaussée) pour 1 poseur européen et 1 poseur nègre; 5° baraque en traverses à 50 mètres de la gare, habitée par le gardien de nuit indigène et sa famille.

Habitations voisines : buvette à 15 mètres de la gare (rez-de-chaussée). A 130 mètres à l'est, au nord de l'oued Chaaba, ferme occupée par 5 indigènes et 2 Européens (tous anciens impaludés). A 300 mètres à l'ouest, buvette européenne et café maure dont les habitants sont tous des anciens paludéens.

Puits voisins : près de la ferme de l'oued Chaaba, noria avec poissons rouges (pas de larves de moustiques). Regard en maçonnerie contenant de l'eau sale et de très nombreuses larves de *Culex pipiens* et *C. spathipalpis* (à sec depuis juillet). Puits inutilisé près de la buvette européenne (le propriétaire s'oppose à la projection de pétrole). Puits abandonné en contre-bas de la maisonnette du brigadier. A sec en été. Au printemps, larves de *C. pipiens* et *C. spathipalpis*.

Village voisin : Aomar, à 2 kilomètres (altitude plus élevée de 100 mètres).

Végétation : Eucalyptus le long de la voie et entre l'oued et la gare. Alentours non cultivés, sauf sur les collines qui surplombent la gare.

Gites à Anopheles : mares laissées dans le lit de l'oued Djemaa, entretenues par des sources, très variables d'un mois à l'autre, larves d'*A. maculipennis* et de *Myzomyia hispaniola* toujours très abondantes. Sur les berges du lit de l'oued ont séjourné, pendant l'été, plusieurs troupes de nomades, sources d'hématozoaires, et sur lesquels on ne pouvait avoir aucune prise. La surface à pétroler variait de 50 à 1,000 mètres carrés.

AGENTS DE LA COMPAGNIE PROTÉGÉS :

1° Indemnes on sensibles (guéris depuis 1 an et demi) :

A Ayant séjourné plus de 3 mois en été 1903	.....	2
B — de 8 jours à 2 mois, —	.....	5

2° Agents infectés ayant eu des accès en été 1902 :

A Ayant séjourné plus de 3 mois en été 1903	......	9
B — de 8 jours à 1 mois —	....	5

§ II. — Antécédents paludiques de cette gare.

Depuis 2 ans, 9 personnes nouvelles venues indemnes ou sensibles sont venues y habiter. Dès 1901, 8 de ces personnes contractaient le paludisme. Une d'elles mourait d'accès pernicieux (le buffetier). En été 1902, sur 4 personnes indemnes ou sensibles, 2 contractaient le paludisme. Cette même année 1902, sur 10 personnes anciennes infectées habitant la gare, 8 avaient des rechutes de fièvre.

§ III. — Mesures prises.

1° *Destruction des larves d'Anopheles.* — Les pétrolages des mares de l'oued Djemaa furent commencés dès le mois de mai (4 mai). On employait chaque fois un estagnon de 17 litres. De très nombreuses larves de *C. fatigans*, qui étaient, comme nous l'avons toujours et partout remarqué en Algérie, précurseurs de celles d'*Anopheles*, vivaient dans les mares de l'oued. Les puits du voisinage, non encore secs, donnaient asile à des myriades de larves de *C. pipiens* et *spathipalpis*, ainsi que l'eau d'infiltration de la cave de la gare. Les premiers jours de juin, de très nombreuses larves d'*Anopheles* firent leur apparition exclusivement dans les mares de l'oued Djemaa.

13 juin. Pétrolage.

8 juillet. Les mares sont moins étendues et les larves plus nombreuses. Les puits sont secs. Pétrolage (les larves appartenaient à l'espèce *Myzomyia hispaniola*).

29 juillet, pétrolage. 14 août, pétrolage. 5 septembre, pétrolages; le nombre des mares a diminué.

26 septembre. A la suite d'un orage, des mares nouvelles se sont formées; larves d'*Anopheles;* pétrolage.

24 octobre. Mares à nouveau desséchées; larves d'*Anopheles;* pétrolage.

20 novembre. Les grandes pluies ont commencé, l'eau est devenue courante dans l'oued; plusieurs mares d'eau sale avec *C. pipiens, spathipalpis, fatigans;* pas de larves d'*Anopheles.*

2° *Défense mécanique des habitations.* — Le 9 mai l'installation des treillis métalliques à toutes les ouvertures des habitations est terminée.

Bâtiments de la Compagnie protégés :

1° Gare (1er étage), bureau au rez-de-chaussée; 2° Maisonnette du acteur; 3° Dépôt : 2 chambres; 4° Maisonnette du brigadier.

La baraque en traverses du gardien de nuit est indéfendable.

Il fut proposé aux habitants du buffet (qui ne font pas partie de la compagnie), et qui sont d'anciens paludéens (donc cause de contagion pour les agents), de placer aux ouvertures de leurs chambres à coucher des cadres métalliques. Cette installation de cadres au buffet ayant éprouvé quelque retard, la buffetière, le 13 juin, réclama avec instance ces mesures de protection, déclarant qu'elle était dévorée par les moustiques qui ne tourmentaient pas, au contraire, les agents défendus. Ces cadres furent placés au buffet dans les premiers jours de juillet. De plus, le puits où l'on puise de l'eau potable est obturé

par un couvercle métallique qui, une fois rabattu, ne joint pas bien; un petit travail de maçonnerie obvie à cet inconvénient.

Nous devons remarquer que l'installation de ces cadres métalliques a servi surtout aux agents de l'exploitation que leur service n'éloigne pas de la gare.

Au contraire, les agents de la voie (brigadier, poseurs), sont souvent obligés de passer toute la journée à plusieurs kilomètres de leurs habitations. Ils font la sieste sous les arbres, quand il y en a, près de la voie (qui longe l'oued à peu de distance constamment), rentrent tard le soir; en somme, ont beaucoup plus de chances de s'infecter. (Il est reconnu, et nous en avons fait maintes fois l'expérience, que les *Anopheles* piquent parfaitement pendant le jour.) De plus, nous avions placé aux portes et fenêtres de la chambre du poseur nègre (au dépôt) des toiles métalliques. Daas cette chambre habitent le poseur et sa femme (une négresse); tous deux sont des anciens paludéens, ayant chaque été des rechutes. Ces nègres couchent presque constamment hors de la chambre, dans le grand hangar du dépôt. Ils ne doivent pas être comptés parmi les sujets protégés et sont, d'autre part, d'autant plus dangereux pour leurs voisins. Le gardien de nuit, indigène, habite dans une baraque en traverses, à 50 mètres de la gare, avec sa femme et un enfant en bas-âge; sa baraque, faite de traverses mal jointes, est indéfendable. Les 3 habitants sont des paludéens; l'enfant a une rate énorme.

§ IV. — Résultats.

1° *Dus aux moyens mécaniques.* — Ils ont été extrêmement nets. Jamais il n'a été trouvé un seul *Anopheles* dans les appartements munis de grillages, alors que dans la baraque en traverses, ouverte à tous les vents, nous avons trouvé des *Anopheles maculipennis* et des *Myzomyia hispaniola*. Cette baraque, comme nous l'avons dit, est située à 50 mètres de la gare.

En juin et en juillet, quelques rares *Culex* furent recueillis dans le bureau et les chambres du chef de gare, provenant des fosses d'aisances.

Les agents anciens dans la gare trouvaient tous une énorme différence entre cet été et les autres étés, au point de vue des moustiques, disant qu'il était impossible, les années précédentes, de travailler le soir au bureau de la gare sans être tourmenté d'une façon intolérable par ces moustiques.

2° *Résultats dus aux pétrolages.* — A chaque visite des mares de l'oued Djemaa, nous avons trouvé de très nombreuses larves

d'*A. maculipennis* et *M. hispaniola*, écloses depuis les précédents pétrolages. Les pétrolages pratiqués copieusement en ont détruit un grand nombre, comme nous avons pu nous en assurer en venant pêcher, une heure ou deux après l'opération, dans les mares pétrolées. Ces mesures ont été pour beaucoup, incontestablement, dans l'absence d'*Anopheles* à l'intérieur des habitations de la gare.

3° *Résultats généraux sur l'état de santé du personnel en expérience.* — Parmi les 7 personnes indemnes qui ont passé toute une partie de l'été à la gare, nous n'avons relevé qu'un cas de nouvelle infection, chez le brigadier de la voie. Le 11 août, il fut pris d'un accès classique de malaria qui se répéta deux autres fois, à 2 jours d'intervalle. Cet homme, infecté dès son premier été de séjour dans cette même maisonnette, en 1901, n'avait pas présenté de symptôme de paludisme en 1902, à la suite d'un voyage en France. On pouvait le considérer comme guéri. Les accès de cet été 1903 semblent donc marquer donc une nouvelle infection. Ce brigadier de la voie se trouvait dans les conditions que nous avons indiquées au sujet des agents de la voie : obligé de rester souvent toute la journée au travail de la voie, sans retourner à son habitation, faisant la sieste en plein air, à proximité de l'oued, ne rentrant que tard le soir, bref, exposé à de multiples causes d'infection, souvent à plusieurs kilomètres de la gare.

Les 6 autres personnes indemnes ou sensibles ne présentèrent aucun symptôme paludéen.

Sur les 14 personnes anciennes infectées qui séjournèrent à la gare, 6 présentèrent des manifestations paludiques variées.

GARE D'IGHZER-AMOKRAN.

Situation : isolée au milieu de la vallée de la Soummam.

Altitude : comparée de l'oued et de la gare : 2 mètres.

Distance de l'oued : 1 kilomètre, environ (sud-est).

Eau potable : apportée tous les jours de Bougie ; la citerne roulante est souvent sale; la citerne permanente est couverte.

Altitude de la gare au-dessus de la mer : 140 mètres.

Distance d'Alger : 206 kilomètres.

Bâtiments des agents de la Cie 1° gare rez-de chaussée, bureau ; (1 étage, appartement du chef de gare); 2° maisonnette de l'homme d'équipe ; 3° maisonnette du brigadier; 4° maisonnette des poseurs indigènes.

Habitations voisines : ferme Florio à 900 mètres au nord ; les fermes qui constituent Amokran sont à 1,500 mètres au nord-est. Quelques gourbis kabyles au sud-est, près de l'oued.

Puits ou sources voisines : au nord, puits de la ferme Florio qui

sert à l'alimentation; au sud, sources dans le lit de la Soummam en été.

Végétation : grands eucalyptus le long de la voie depuis la gare jusqu'à la maisonnette du brigadier; au nord, vignes; au sud, terrains incultes, brousse de *Chamoerops*, lentisque, genêts, jujubiers sauvages.

Gites à Anopheles : mares alimentées par des sources, dans le lit

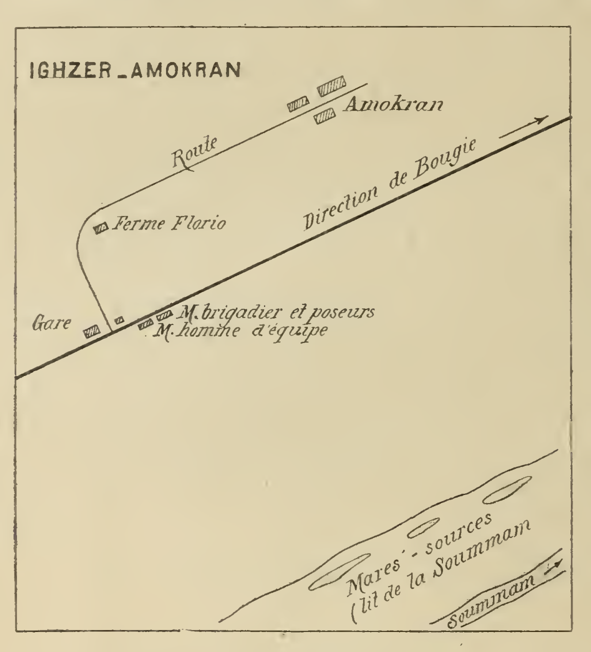


Fig. 6.
Gare d'Ighzer-Amokran.

de l'oued à 1 kilomètre de la gare; ces mares furent variables comme étendue pendant l'été. Elles contenaient toutes des herbes en abondance, des joncs croissaient sur leurs bords.

Une mare d'eau de pluie, près de la ferme Florio, a contenu quelques larves d'*Anopheles* en juin 1903; cette mare sécha en quelques jours.

AGENTS PROTÉGÉS

Indemnes ou sensibles ayant séjourné plus de 3 mois en été 1903	3
Indemnes ou sensibles ayant séjourné de 8 jours à 2 mois.	5
Anciens infectés ayant séjourné plus de 3 mois	3
Anciens infectés ayant séjourné de 8 jours à 2 mois d'été.	2

§ II. — Antécédents paludiques de cette gare.

La gare d'Ighzer-Amokran jouit d'une réputation méritée d'insalubrité. Il suffisait aux agents d'y passer quelques jours pour y contracter un paludisme grave, qu'ils gardaient longtemps. Depuis 8 ans, 6 personnes indemnes ou sensibles sont venues habiter cette gare. Toutes les 6 prenaient les fièvres, dès le premier été. L'an dernier, il n'y est pas venu de personnes nouvelles ou sensibles.

§ III. — Mesures prises.

1° *Destruction des larves d'Anopheles.* — Dès le mois de mai (22 mai), les sources-mares de la Soummam furent pétrolées. On n'employa que 2 ou 3 litres de pétrole chaque fois.

10 juillet, pétrolage. 23 juillet, pétrolage. 10 août, pétrolage. 8 septembre, pétrolage. Les anciennes mares ont séché; de nouvelles se sont formées, là où auparavant il y avait un bras de la Soummam à vif courant. La Soummam a un courant toujours rapide. Son lit a 300 à 400 mètres de largeur.

2° *Défense mécanique des habitations.* — L'installation des grillages fut terminée le 18 juillet.

Bâtiments défendus : bureau et appartement du chef de gare.

Maisonnette de l'homme d'équipe; du brigadier; des poseurs indigènes.

Observations. — L'homme d'équipe indigène, ancien infecté, faisait la sieste en plein air, comme c'est l'habitude chez les indigènes. La nuit, des indigènes, parents ou amis, venaient profiter de son toit; ces indigènes étaient tous plus ou moins infectés. Nous avons fait mettre aussi des grillages aux ouvertures de la petite maisonnette des poseurs indigènes, voisine de celle du brigadier. Cette habitation, solidement construite et bien couverte, a les parois intérieures de ses murs couvertes de suie, et l'aspect de l'intérieur de cette maisonnette est le même que celui d'un gourbi, noir, sale et repoussant. Or, les indigènes qui l'habitent passent la plupart du temps la nuit à la belle étoile, enveloppés dans leurs burnous, la tête appuyée sur le bord du mur de la demeure que leur a fournie la Compagnie. Souvent même la porte grillagée était maintenue ouverte par une grosse pierre. La négligence, l'incurie, le mauvais vouloir de ces indigènes, presque tous gravement impaludés, augmentaient les difficultés de la défense des agents. Au printemps, habitaient dans cette maisonnette 4 enfants kabyles, infectés les années précédentes à Ighzer-Amokran, dont 3 présentaient des rates énormes. Chez un d'eux, âgé de 6 ans, le rebord inférieur de la rate atteignait l'ombilic.

§ IV. — Résultats.

1° *Dus aux pétrolages.* — Commencé le 22 mai, ils ne purent être pratiqués en juin. D'autre part, les grillages, n'ayant été placés que le 18 juillet, n'ont pas pu venir corroborer l'effet des pétrolages ; c'est ce qui explique l'irruption d'*Anopheles maculipennis* et de *Myzomyia hispaniola* qui se produisit les premiers jours de juillet (avant les grillages). Le 10 juillet, on recueillait 24 *M. Hispaniola* et 1 *A. maculipennis* dans les chambres de l'homme d'équipe.

2° *Résultats dus à la défense mécanique.* — Les retards apportés à l'application des treillis métalliques aux ouvertures furent la cause que quelques rares *Anopheles* furent récoltés (après la pose) dans les appartements préservés ; ils s'étaient introduits avant la pose : le 23 juillet on récoltait 1 *A. maculipennis* chez le chef de gare, 1 *A maculipennis* et 1 *M. hispaniola* chez l'homme d'équipe, qui s'étaient introduits avant la pose des grillages ; le 8 septembre, 1 *A. maculipennis* chez le chef de gare. En octobre, une irruption de *Culex* eut lieu à la gare. Le plus souvent, les *Culex* ont leurs gîtes à l'état larvaire dans les fosses d'aisance, c'est ce qui explique le grand nombre de *Culex* à l'intérieur des appartements ; au contraire, aucun *Anopheles* ne put y pénétrer à cette époque.

3° *Résultats généraux sur la santé du personnel en expérience.* — 3 personnes indemnes ou sensibles ont passé tout l'été sans symptôme de paludisme.

Parmi 5 autres personnes indemnes ou sensibles ayant séjourné de 8 jours à 2 mois, nous relevons 1 seule personne ayant présenté des symptômes que nous avons mis sur le compte du paludisme, bien que ce diagnostic soit fortement douteux : le brigadier de la voie déclara à la fin d'août avoir des sueurs froides la nuit, puis des sueurs chaudes, avec de la fatigue les jours suivants ; il n'a jamais été obligé d'abandonner son travail, il ne s'est jamais alité ; comme ces symptômes se sont répétés avec assez de régularité, pendant quelque temps, tous les 2 ou 3 jours, nous avons pensé au paludisme. La région splénique n'a jamais été douloureuse. L'examen du sang, fait, il est vrai, quelques jours après ces malaises, ne nous a jamais rien montré d'anormal.

En somme, c'est un cas très douteux.

Ce brigadier était dans les mêmes conditions que celui de Dra-el-Mizan, se trouvant souvent à plusieurs kilomètres de la gare à l'heure de la sieste.

2 personnes anciennes infectées, ayant séjourné tout l'été eurent toutes deux des rechutes de leur infection, datant de l'an dernier, à

Mirabeau. Chez 3 autres, ayant séjourné de 8 jours à 2 mois, deux, venant d'Akbou, eurent des rechutes.

Nous ne faisons pas figurer dans notre statistique l'homme d'équipe indigène, sa femme, les poseurs indigènes qui couchaient dehors, ne prenaient aucune précaution.

GARE DE TAKRITS-SEDDOUK.

Situation : partie resserrée de la vallée de la Soummam, entre collines élevées.

Altitude comparée de la gare et de l'oued : 8 mètres environ.

Distance de l'oued : 100 mètres.

Eau potable : puits couvert derrière la maisonnette de l'homme d'équipe, eau bonne, mais insuffisante en été.

Altitude de la gare au-dessus de la mer : 111 mètres.

Distance d'Alger : 213 kilomètres (de Bougie 48 kilomètres).

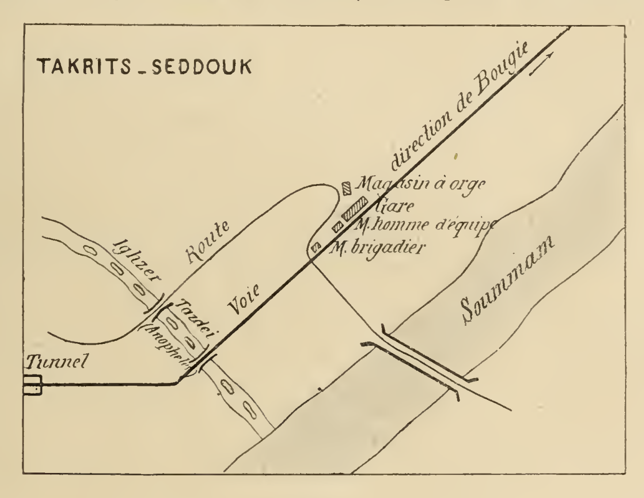


Fig. 7.
Gare de Takrits-Seddouk.

Bâtiments de la Compagnie : 1° gare, rez-de-chaussée, bureau ; 1er étage, appartement du chef de gare ; 2° maisonnette de l'homme d'équipe, à 30 mètres ; 3° maisonnette du brigadier, à 100 mètres au sud-ouest.

Habitations voisines : 1° près de la maisonnette du brigadier, baraque en traverses mal jointes, où habitent les poseurs dont 1 Européen et les autres indigènes, impaludés depuis longtemps ; 2° près de la gare, un magasin à orge, où couchent des indigènes.

Puits voisins : puits du brigadier, couvert (derrière la maison du brigadier.

Village voisin : Sidi-Aïch, 5 kilomètres.

Végétation : gare enfouie au milieu de grands eucalyptus. Oliviers et caroubiers sur les collines qui dominent la gare.

Gîtes à Anopheles : mares laissées dans le lit d'un torrent à 100 mètres au sud-est des habitations. Ce torrent, désigné sous le nom d'Ighzer-Tazdei (Ravin des dattes, en kabyle) roulait en avril des eaux tumultueuses, descendant des hautes montagnes voisines. La pente de ce ravin est très prononcée. Les premiers jours de juin, une longue série de flaques d'eau stagnante au milieu d'énormes cailloux roulés, remplaçaient le courant impétueux. Des larves de *M. hispaniola* y pullulaient dès le 19 juin. Ces mares, entretenues par des sources à faible débit, ne séchèrent qu'en partie durant l'été. Il y eut constamment de l'eau dans quelques-unes d'entre elles, eau contenant des larves d'*A. maculipennis et de M. hispaniola,* en compagnie de larves de *C. fatigans.*

La Soummam, très resserrée en ce point de son immense vallée passe sous un pont près de la gare. Elle a toujours présenté un courant suffisamment fort pour empêcher les *Anopheles* de pondre sur ses bords.

AGENTS DE LA COMPAGNIE PROTÉGÉS

Personnes indemnes ou sensibles ayant séjourné tout l'été.....	4
— — ayant séjourné 1 mois..................	1
Anciens infectés ayant séjourné tout l'été..................	4
Anciens infectés ayant séjourné 1 mois......................	1

§ II. — Antécédents paludiques de cette gare.

Le renom d'insalubrité particulière de cette gare lui a fait donner par les agents le surnom d'Antechrist? Depuis 7 ans, sur 9 personnes nouvelles venues, indemnes ou sensibles, 6 contractaient le paludisme dès la première année de séjour.

§ III. — Mesures prises.

1° *Destruction des larves d'Anopheles.* — Les pétrolages, qui nécessitaient à chaque opération deux à trois litres de pétrole, furent pratiqués :

19 juin; 11 juillet; 24 juillet; 11 août; 9 septembre. En novembre, le torrent avait repris son cours habituel.

2° *Défense mécanique des habitations.* — Le 11 juillet, l'installation des grillages fut terminée aux trois bâtiments (bureau et premier

étage, maisonnette de l'homme d'équipe indigène, maisonnette du brigadier).

Quelques *Anopheles maculipennis* et *M. Hispaniola* avaient pénétré quelques jours avant cette date, dans les appartements, aucune femelle n'y fut recueillie pendant tout le reste de l'été, après la pose des grillages.

§ IV. — Résultats dus aux pétrolages et a la défense mécanique.

Les deux méthodes combinées réussirent à empêcher tout *Anopheles* de pénétrer dans l'intérieur des appartements.

La maisonnette du brigadier, placée à très petite distance de l'Ighzer-Tazdei, était visitée l'année dernière par de nombreux moustiques ; cette année, les habitants des trois maisonnettes ne s'aperçurent pas de la présence de ces insectes.

Résultats sur la santé du personnel en expérience :

4 personnes indemnes ou sensibles ayant séjourné plus de 3 mois et une personne ayant séjourné un mois n'eurent aucun symptôme de paludisme.

4 anciens infectés ayant séjourné tout l'été n'eurent pas de rechutes ; 1 ancien infecté ayant séjourné 1 mois eut des rechutes en septembre.

Le brigadier et sa femme, qui avaient vu leur premier enfant contracter la fièvre dès son premier été de séjour, il y a trois ans, dans cette même maisonnette, se félicitèrent d'avoir vu leur second enfant, âgé de huit mois, passer son premier été à Takrits sans aucun symptôme de paludisme.

L'homme d'équipe indigène, infecté les années précédentes aux environs d'Akbou, avait, au mois d'avril, sa rate dépassant de un travers de doigt le rebord des fausses côtes ; en novembre, la rate n'était plus sentie à la palpation, il n'y avait donc pas eu de réinfection en 1903.

GARE DES OULED-RAHMOUN.

Situation : vallée de l'oued Boumerzoug, affluent de l'oued Kebir, entre des collines peu élevées.

Altitude comparée de l'oued et de la gare : même altitude.

Distance de l'oued : 100 mètres au sud.

Eau potable : puits voisin, eau saumâtre parfois.

Altitude au-dessus du niveau de la mer : 688 mètres.

Distance d'Alger : 436 kilomètres.

Bâtiments de la Compagnie : 1° Gare : rez-de-chaussée, bureau du chef de gare, bureau des messageries ; premier étage, appartements

du chef de gare et du facteur en premier ; 2° chambre où couchent 6 mécaniciens (en roulement, ils ne couchent que 2 ou 3 nuits par semaine); 3° maisonnette des facteurs (3 appartements ; 4 chambres); 4° maisonnette des visiteurs (3 appartements ; 7 chambres); 5° chambre de l'aide-visiteur (près du hangar); 6° maisonnette du brigadier (2 appartements ; 6 chambres); 7° buffet (3 chambres).

Habitations voisines : A 100 mètres de la gare, près de la route

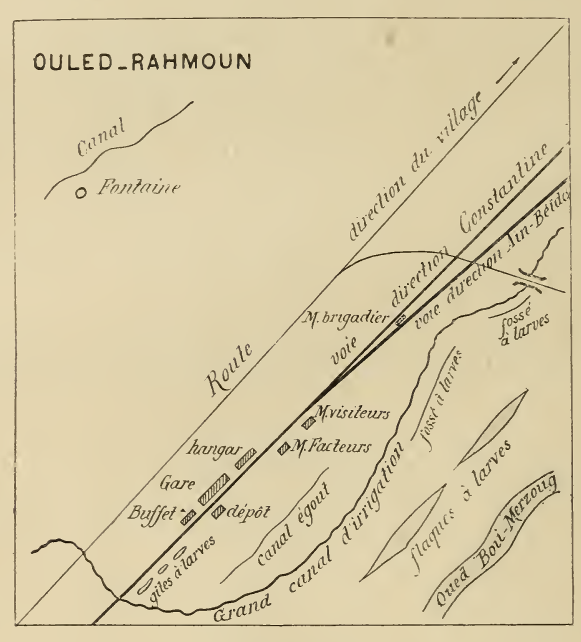


Fig. 8.
Gare des Ouled-Rahmoun.

conduisant au village, tentes où habitent les familles des gardiens de nuit indigènes. A l'est, sur une colline, près de la maisonnette du brigadier, tentes et baraque en traverses mal jointes, où habitent les familles des gardiens de ligne indigènes.

Canaux d'irrigation : 1° A 150 mètres au nord, canal parallèle à la voie, plus élevé de 5 mètres ; sec la plus grande partie de l'été ;

2° Au sud, entre l'oued et la gare, à 40 mètres de la maisonnette du facteur, un canal d'irrigation, à courant rapide, qui ne fut jamais à sec durant tout l'été ;

3° Plus au sud, à 300 mètres, un troisième canal, plus élevé de 4 mètres environ, sur le flanc d'une colline. L'oued n'a jamais été à sec.

Végétation : Bois de pins devant la gare ; saules le long des canaux ; céréales au nord ; luzernières et prairies au sud.

Village voisin : Ouled-Rahmoun à 2 kilomètres, caché par une colline.

Gîtes à Anopheles : Nous avons trouvé des larves d'*Anopheles* beaucoup plus tard qu'en Kabylie et que dans la Mitidja. Pour la première fois, le 17 juillet, nous avons vu de ces larves. Sur les Hauts Plateaux, la saison chaude est plus tardive que sur le littoral ; la saison des fièvres est aussi plus tardive, mais elle éclate plus brusquement. Les gîtes à larves d'*Anopheles* furent les suivants :

1° Petit fossé (canal de détournement), parallèle au grand canal d'irrigation à courant rapide qui longe la voie à 40 mètres au sud de la maisonnette du facteur. Ce petit fossé-canal n'est séparé du grand canal d'irrigation que par une épaisseur de 50 centimètres ; il reçoit à intervalles périodiques très éloignés l'eau courante du grand canal d'irrigation qu'il longe. De mai à novembre, une seule fois, le 26 août, nous y avons de l'eau courante. Le reste du temps, comme il a très peu d'inclinaison, il conserve plusieurs semaines de l'eau stagnante retenue par une végétation luxuriante de papyrus, de 60 à 80 centimètres de hauteur. Le voisinage du grand canal y maintient l'humidité par des fuites à travers la mince paroi de terre qui les sépare. Le 17 juillet nous y trouvâmes, en grande quantité, des larves d'*Anopheles maculipennis*, ainsi que le 17 octobre ;

2° Flaques d'eau stagnante séjournant dans des dépressions de la prairie au sud de la gare, prairie située entre le grand canal d'irrigation et l'oued Boumerzoug. Ces flaques provenaient des pluies de la fin du mois de septembre. Le 7 octobre, larves d'*Anopheles ;*

3° Petit fossé-canal longeant le canal à courant rapide, à l'est, près d'un pont, à 100 mètres de la maisonnette du brigadier. Le 5 août, nombreuses larves d'*Anopheles ;* 26 août, larves d'*Anopheles ;* plus tard jamais plus de larves ;

4° A l'ouest de la gare, à 80 mètres, flaques d'eau résultant d'une irrigation précédente de la prairie qui est au bord de la voie (flaques sur une longueur de 150 mètres, le 7 octobre).

Ces gîtes à *Anopheles* sont donc très variables selon les irrigations ; ils ne sont jamais dus qu'au voisinage des fossés-canaux mal entretenus et qu'à des dépressions dans les prairies. Cette eau d'irrigation séjournant dans ces dépressions n'a aucune utilité au point de vue de l'agriculture. Nous n'avons pas trouvé, dans un périmètre de 800 mètres autour de la gare, d'autre gîte à *Anopheles* que ceux dont nous venons de parler.

§ II. — Antécédents paludiques de cette gare.

Depuis 12 ans. 37 personnes indemnes ou sensibles y sont venues. Le premier été de séjour, 31 contractaient le paludisme. Un enfant mourait de bilieuse hématurique. En 1902, sur 18 indemnes ou sensibles, 6 s'infectaient. Sur 11 anciens infectés, 10 avaient des rechutes en 1902.

§ III. — Mesures prises.

Nous avons essayé de faire éloigner de la gare les tentes des familles des gardiens de lignes indigènes, source d'hématozoaires sur lesquelles aucune prise n'était possible. Nous n'avons pas pu y réussir.

1° *Destruction des larves d'Anopheles.* — Le premier pétrolage fut pratiqué le 8 juin. C'était, à vrai dire, un pétrolage préventif; il fut pratiqué sur les gîtes supposés (gîtes qui d'ailleurs fourmillèrent de larves d'*Anopheles* dans le courant de l'été). Ces pétrolages étaient destinés à empêcher les *Anopheles* de venir pondre à la surface des eaux (fossé-canal parallèle au canal d'irrigation à 40 mètres de la maisonnette du facteur). Le 17 juillet, pétrolage pratiqué sur ce même fossé-canal, cette fois rempli de larves d'*Anopheles*.

5 août, pétrolage du canal à 100 mètres de la maisonnette du brigadier.

26 août, pétrolage de ce même canal.

14 septembre, pétrolage des flaques de la prairie.

7 octobre, pétrolage du petit canal à 40 mètres des facteurs et des flaques d'eau à 80 mètres à l'ouest.

2° *Défense mécanique.* — L'installation des grillages ne fut terminée que le 25 août. Ce retard énorme fut très préjudiciable à la campagne, car les 3 pétrolages pratiqués avant cette date ne purent défendre les habitations de l'invasion des *Anopheles* hiverneuses qui, les premiers jours de juillet, envahirent les appartements.

Les 7 appartements déjà désignés furent protégés. Par erreur, le service de la voie fit placer des grillages aux ouvertures des 3 chambres du buffet, destinées aux voyageurs; la buffetière, appréciant les avantages que procuraient ces moustiquaires aux agents qui en étaient pourvus, préféra prendre à son compte la dépense de ces cadres grillagés, plutôt que de se les voir enlever. Nous avons fait poser des toiles métalliques aux ouvertures d'une chambre attenant au dépôt, où couchaient des mécaniciens, pour la plupart infectés, et qui n'y couchaient que 2 ou 3 fois par semaine. Dans les maisonnettes où il y avait beaucoup d'enfants, les grillages des portes à tambour étaient laissées très souvent ouvertes, ils ont été vite détériorés.

Les cadres-portes à deux battants placés au bureau du chef de gare et au bureau des messageries ont été, la plupart du temps, maintenus ouverts dans la journée, à cause des allées et venues incessantes des agents ; mais, le soir venu, ceux-ci les fermaient, au moment où les *Anopheles* commencent à voler. Le cadre-porte du bureau des messageries est clos de 8 heures à minuit; durant cet espace de temps, il n'y a pas de passage de train à la gare, et un facteur est obligé par son service d'y rester pendant ces heures particulièrement dangereuses. C'est à ce moment que les cadres-portes sont surtout utiles.

§ IV. — Résultats dus.

1° *Aux pétrolages.* — Les pétrolages, jusqu'au 25 août, ont été insuffisants, puisqu'ils ne pouvaient pas porter sur les adultes hiverneuses; ils ont détruit ensuite beaucoup de larves pondues par ces dernières.

2° *Aux moyens mécaniques.* — Tandis qu'avant la pose des grillages, le 3 juillet, on récoltait 40 *Anopheles* dans les appartements et le 17 juillet, 5, et le 5 août, 6 *Anopheles;* après la pose des grillages, on ne récolta en tout, les 26 août, 31 août, 14 septembre, 7 octobre, 27 novembre, que 3 *Anopheles*, dans les maisonnettes où les habitants laissaient par négligence les portes ouvertes,

3° *Résultats sur la santé du personnel en expérience.* — Quelques temps après que les *Anopheles* adultes hiverneuses faisaient irruption dans les appartements, irruption contre laquelle on n'avait pas pu opposer de barrière, plusieurs cas de paludisme éclataient parmi les habitants de la gare.

Aucune mesure contre les *Anopheles adultes* n'ayant été prise à cette époque, nous ne pouvons pas compter ces personnes parmi celles que nous avons défendues. 3 enfants et 2 grandes personnes eurent des symptômes cliniques suffisamment nets pour poser le diagnostic d'une façon précise : l'examen du sang, la palpation de la rate, et la marche de la maladie ne laissaient aucun doute sur la nature de la maladie.

Après l'installation des grillages, et la répétition des pétrolages, le nombre des *Anopheles* fut de beaucoup réduit dans les appartements de même que les cas de fièvre (quoique les mois d'août, septembre et octobre soient réputés à juste titre les plus malsains de la saison chaude).

Sur 20 personnes indemnes ou sensibles, ayant séjourné plus de 3 mois, 1 personne contractait le paludisme, en octobre. Le facteur N..., revenant d'un congé en France, eut, quelques jours après son

arrivée à la gare des Ouled-Rahmoun, des frissons, des malaises suivis de fatigue, qui présentèrent une périodicité que nous mîmes sur le compte du paludisme.

Ces malaises périodiques cédèrent à la quinine. C'est en somme un cas douteux. L'examen du sang ne put être fait qu'après l'absorption de quinine. Vers la fin d'octobre, un homme d'équipe arrivant de France eut 3 jours après son arrivée à la gare, un accès typique, qui se reproduisit 8 jours après.

Nous n'avons pu voir ce malade que 3 semaines après l'apparition de ces symptômes, qui ne se reproduisirent plus, du reste, après l'absorption de quelques doses de quinine. Les accès ayant débuté 3 jours seulement après l'arrivée de cet homme à la gare des Ouled-Rahmoun, il est probable qu'il a contracté la paludisme en route avant son arrivée, la durée de l'incubation étant, comme l'on sait, de 8 à 10 jours, néanmoins, nous comptons ce cas pour suivre une règle. Donc, sur 20 personnes indemnes ou sensibles ayant séjourné plus de 3 mois : 1 cas douteux, et sur 2 ayant séjourné de 8 jours à 1 mois : 1 cas.

Sur 21 personnes anciennes infectées, 17 eurent des manifestations paludiques diverses, les une intenses (accès répétés), les autres bénignes (malaises à répétition, céphalalgies, splénalgies, etc.).

CONCLUSIONS

Sur 62 personnes indemnes ou sensibles ayant séjourné l'été 1903 dans les 7 gares défendues, 4 contractaient le paludisme, ce qui fait 6, 45 0/0, alors que l'année précédente ce rapport était de 35, 2 0/0 (chez 34 sujets).

Parmi 65 anciens infectés, 31 eurent des rechutes, soit 47,7 0/0, alors que l'année précédente, ce rapport était de 93,4 0/0 (chez 46 sujets)[1].

Doit-on attribuer cette diminution dans le nombre des cas de première invasion, constatée cette année, à une diminution générale dans l'intensité de l'endémie palustre dans les régions où nous avons opéré, diminution d'intensité qui n'aurait aucun rapport avec les mesures prises contre les *Anopheles*? Nous avons, pour élucider cette question, demandé aux médecins qui exercent dans les localités voisines des gares s'ils avaient eu, cet été 1903, parmi leurs malades, des paludéens. Nous remercions vivement nos distingués confrères, qui ont bien voulu nous communiquer ces renseignements. La plupart nous ont tout

1. Il est évident que bon nombre de prétendues rechutes sont des réinfections.

d'abord fait remarquer que les colons appellent rarement le médecin pour les fièvres, qu'ils soignent eux-mêmes le plus souvent, et qu'ils n'ont recours à lui que dans les cas très graves ; que par conséquent, le nombre de cas que les praticiens peuvent observer est très inférieur à ceux qui se manifestent en réalité. Par contre, surveillant nous-même étroitement, au point de vue du paludisme, toutes les personnes habitant les gares défendues, nous avons eu l'occasion de relever des manifestations très bénignes, qui auraient certainement passé inaperçues sans interrogatoire et sans examen clinique et microscopique. Nous avons relevé deux cas de nouvelle invasion (brigadier d'Amokran et facteur des Ouled-Rahmoun) dont certes les patients ne se sont pas beaucoup plaints, et qui n'en constituaient pas moins, par leur marche clinique, des manifestations paludiques. Voici les chiffres qu'ont bien voulu nous donner les médecins locaux : Dr Pidoucet (Alma) : de fin août à fin septembre, sur 16 cas de fièvre, 4 cas de première invasion au village de l'Alma et aux environs.

Dr Bouton (Akbou) constate 28 cas de paludisme sur 72 malades venus à la consultation, les cas de paludisme étaient originaires, pour la plupart, de Beni-Mançour, dans la même vallée qu'Ighzer-Amokran et Takrits-Seddouk.

Dr Creutz (Aïn-Mlila) : au village des Ouled-Rahmoun tous les habitants sont d'anciens infectés ; deux nouveaux venus cet été y ont pris les fièvres, aussitôt arrivés.

Dr Prengrueber (Palestro) : la population entière de Thiers est composée d'anciens infectés.

Dr Wolters (Tizi-Ouzou) constate, au contraire, une diminution manifeste cette année dans l'intensité du paludisme au village de Mirabeau, voisin de la gare défendue. Or, nous avons pétrolé tous les gîtes à *Anopheles* dans un périmètre d'un rayon de 800 à 900 mètres autour de la gare. Le village de Mirabeau tout entier se trouve englobé dans ce périmètre (voir le plan.) Ce fait explique la diminution du nombre des cas de paludisme au village, par suite de la diminution du nombre d'*Anopheles*. En somme, le village entier a profité des mesures prises en faveur de la gare. Donc, sauf en ce qui concerne Mirabeau, et pour les raisons indiquées, le paludisme sévissait en 1903 dans les régions voisines des gares que nous avons défendues.

Si l'on jette un coup d'œil sur les observations résumées qui ont été rapportées de la défense de chaque gare, on voit que pour chacune d'elles se réalise le schéma étiologique de la fièvre paludéenne: toujours, nous trouvons des personnes infectées qui ont conservé l'hémamibe dans leur organisme ; elles constituent le réservoir du virus; toujours nous trouvons les gîtes à larves d'*Anopheles*, d'où sortent ces propagateurs du paludisme ; nous trouvons enfin des personnes nouvelles venues, proies désignées à la piqûre des moustiques et à l'infection paludéenne.

Les personnes infectées, qui conservent les hématozoaires d'un été à l'autre, sont surtout les indigènes. Les Européens anciens infectés qui habitent les gares ont tous pris, plus ou moins, de la quinine. De plus, comme les non-infectés, ils sont à l'abri des piqûres des *Anopheles*, dans leurs chambres munies de grillages. Mais les indigènes, arabes ou kabyles, se traitent peu ou mal par la quinine, et ils passent volontiers la nuit à la belle étoile, même quand on leur donne des maisonnettes bien construites (gare d'Ighzer-Amokran) et enfin, un certain nombre d'entre eux viennent habiter ou camper près des gares, sans être employés de la Compagnie, (nomades établis en été 1903 près de la gare de Dra-el-Mizan). A l'Alma : homme d'équipe arabe et sa famille ; à Mirabeau, gourbis kabyles ; à Dra-el-Mizan, poseurs et gardiens de nuit indigènes ; à Amokran, poseurs et gourbis kabyles près du lit de la Soummam ; aux Ouled Rahmoun, tentes des familles des gardiens de nuit. Dans toutes les gares, il y a des hommes d'équipe indigènes.

Nous avons recherché l'index endémique chez les indigènes des 7 gares : 33 furent examinés, 15 d'entre eux portaient des grosses rates paludéennes et, parmi eux, 3 montrèrent des parasites dans leur sang, en dehors de tout état fébrile. De plus, un autre indigène, dont la rate n'était pas hypertrophiée, présentait des hémamibes. L'index endémique se traduit donc par 48,5 0/0 indigènes infectés.

Pour compléter les renseignements que fournit l'index endémique, nous donnons un tableau indiquant le nombre d'*Anopheles* disséqués et celui des *Anopheles* trouvés naturellement infectés dans les gares défendues ou dans leur voisinage, en 1903.

Le 11/V,	à l'Alma.	2	examinés,	0. infectés	l'*A. macul.* et *A. alger*
9/VI,	Birtouta.	2	—	—	*A. macul.*
27/VI,	Ighzer.	7	—	—	*Myzom. hispan.*
30/VI,	Oued-Athmenia,	10	—	—	*A. macul.*
1/VII,	Mirabeau.	1	—	—	*A. macul.*
3/VII,	Ouled-Rahmoun.	21	—	—	*A. macul.*
8/VII,	Dra-el-Mizan.	1	—	—	*Myzom. hispan.*
17/VII,	O. Rahmoun.	4	—	—	*A. macul.*
20/VII,	Amokran.	7	—	—	*M. hisp.*(6) et *A. macul*(1)
21/VII,	Takrits.	1	—	—	*A. macul.*
25/VII,	Alma.	1	—	—	*A. macul.*
5/VIII,	O. Rahmoun.	2	—	1 inf.	*A. macul.*
26/VIII,	O. Rahmoun.	1	—	—	*A. macul.*

L'un des *Anopheles* de l'examen du 5/VIII contenait des sporozoïtes dans la cavité cœlomique. Cela donne pour le pourcentage des *Anopheles* trouvés infectés naturellement, le chiffre de 1,66 0/0.

Le seul moyen d'éviter la contagion du paludisme chez des indigènes serait évidemment de les éloigner des habitations européennes. A vouloir réaliser ce desideratum, on se heurte à de grosses difficultés. Les Arabes et les Kabyles viennent se grouper autour des gares qui les font vivre. Nous avions demandé qu'aux O. Rahmoun, les tentes des familles des gardiens de nuit indigènes fussent éloignés de la gare; nous n'avons pas pu l'obtenir.

Les gîtes à larves d'*Anopheles*, dont nous avions étudié la formation dans un autre travail[1], étaient constitués par des mares laissées dans le lit des oueds, ou des sources. Dans un pays aussi sec que l'Algérie, les mares provenant directement des eaux de pluie ont peu d'importance, elles ne durent pas assez longtemps pour devenir dangereuses. Les croquis de la page 75, qui représentent l'état des mares subsistant dans le lit de l'oued Djemaa, à divers moments de l'été, montrent comment varient ces gîtes à larves suivant les crues ou la sécheresse; les fluctuations dans le cours de l'oued dépendent à leur tour, non de la chute d'eau locale, mais des pluies et des orages lointains, dans les montagnes qui alimentent cet oued.

Les larves trouvées dans ces gîtes étaient : dans la Mitidja, des *Anopheles maculipennis* et *A. Algeriensis*; en Kabylie, des *A. maculipennis* et *Myzomyia hispaniola*; sur les Hauts-Plateaux, des *A. maculipennis* [2].

1. Formation des gîtes à larves d'*Anopheles* en Algérie. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVII, p. 763, novembre 1903.

2. Ed. et Et. Sergent, Présence de *Myzomyia hispaniola* en Algérie. *Soc., Biologie*, t. LV, p. 1361, 14 nov. 1903.

Les pétrolages ont toujours été possibles et n'ont jamais entraîné d'inconvénient ni pour les cultures, ni pour les bestiaux. Dans le canal de l'Alma, le courant entraînait au bout de quelques heures la mince couche de pétrole répandue à la surface de l'eau. D'ailleurs, les bergers mènent le plus souvent leurs troupeaux s'abreuver à l'oued Boudouaou voisin, où l'eau est plus accessible et d'un courant plus rapide. Dans les marécages de la Soummam, il existe des trous d'eau où viennent d'habitude boire les bestiaux : ces trous d'eau représentent le type des r'dirs (mares servant d'abreuvoir où les bestiaux viennent boire directement, en mettant les pieds dans l'eau). Or, l'eau de ces r'dirs est sans végétation, et, comme elle est bourbeuse (après le passage d'un troupeau), elle ne présente pas les conditions favorables à la vie des *Anopheles*. Nous n'y avons d'ailleurs jamais trouvé de larves. Nous avons donc respecté ces mares. Au contraire, nous faisions pétroler les flaques d'eau à végétation luxuriante, souvent entourées de joncs, de broussailles, qui empêchent les bestiaux d'approcher, car ces flaques contenaient toujours des larves d'*Anopheles*. Dans l'oued Djemaa, ces broussailles n'existaient pas, mais les petites sources ne contenaient pas elles-mêmes des larves, à cause de leur faible courant. Aux ouled Rahmoun, les gites à *Anopheles* ne sont constitués que par des flaques peu profondes d'eau stagnant au creux des prairies, au fond des fossés, dans l'intervalle des irrigations, flaques dont le pétrolage ne présente aucun inconvénient.

Les agents des gares se sont, en général, félicités de l'application des grillages à leurs portes et fenêtres. D'ailleurs, nous avions prié la Compagnie d'agrandir certaines lucarnes, de rectifier certaines dispositions, à l'effet de rendre l'emploi des cadres grillagés le plus commode possible. Ces mesures ne gênant pas les agents et, au contraire, les préservant de l'ennui des mouches et des autres insectes, elles ont été bien accueillies par les intéressés, tandis que pour les masques et les gants, par exemple, qui sont gênants, on aurait trouvé du mauvais vouloir. Aussi, cette année, nous sommes-nous gardés de proposer ces moyens de défense personnelle. La plupart des agents, comprenant l'intérêt que présentaient pour eux les précautions prises, avaient soin des grillages, ils constataient, en effet, qu'ils n'étaient plus ou presque plus importunés,

comme les années précédentes, par les moustiques. Dans quelques maisonnettes où habitaient des familles très nombreuses, avec des enfants, les cadres étaient maintenus ouverts, la plupart du temps, malgré l'appareil de fermeture automatique ; les cadres des fenêtres étant fixes, les chances d'infestation de l'appartement étaient pourtant toujours diminuées. Ces maisonnettes où les agents étaient négligents, d'ailleurs, n'étaient pas nombreuses. Les agents qui ont le mieux apprécié les portes grillagées sont ceux que leur service maintient la nuit dans les bureaux du rez-de-chaussée avec les lampes allumées. La lecture de notre rapport montre, pour chaque gare, qu'après le commencement des pétrolages et la pose des grillages, on n'a trouvé que des rares *Anopheles* (quelquefois aucun) dans les appartements où ils foisonnaient avant l'exécution de ces mesures.

En résumé : les pétrolages ont toujours été possibles et efficaces; les cadres grillagés appliqués aux ouvertures des appartements ont corroboré puissamment l'effet des pétrolages.

Une diminution très notable a été constatée dans le nombre des cas de première invasion chez les nouveaux arrivants, après l'installation complète des grillages et la mise en pratique des pétrolages (en 1902, 35,2 0/0; en 1903, 6,45 0/0). C'est ce que montre le tableau suivant :

NOUVEAUX VENUS INDEMNES OU SENSIBLES

GARES	ANNÉES PRÉCÉDENTES (y compris 1902).			1902		1903			
	Statistique remontant à	Nombre de sujets.	Cas de 1re invasion dès le 1er été de séjour.	Nombre de sujets.	Cas de 1re invasion	Nombre de sujets ayant séjourné plus de 3 mois.	Cas de 1re invasion	Nombre de suj. ayant séjourné de 8 j. à 2 m.	Cas de 1re invasion.
Dra-el-Mizan.	2 ans.	9	8 (1 meurt).	4	2	2	1	5	0
Thiers.	2 —	5	1	3	0	5	0	1	0
Mirabeau.	1 —	6	4	6	4	8	0	0	0
Takrits-Seddouk.	7 —	9	6	3	0	4	0	1	0
Ighzer-Amokran.	8 —	6	6	0	0	3	0	5	1 (douteux).
Ouled Rahmoun.	12 —	37	31 (1 meurt).	18	6	20	1	2	1 (douteux).
Alma.	8 —	9	9	Défendue. 4	0	5	0	1	0
Pourcentage des cas de première invasion, dès le premier été de séjour.	79,3 0/0.			35,2 0/0. (Sans l'Alma défendue.)		6,45 0/0.			

ANCIENS INFECTÉS

GARES	1902		1903			
	Nombre de sujets.	Cas de rechutes.	Nombre de sujets ayant séjourné plus de 3 mois.	Cas de rechutes.	Nombre de sujets ayant séjourné 8 j. à 2 m.	Cas de rechutes.
Dra-el-Mizan.	10	8	9	6	5	0
Thiers.	4	4	4	2	0	0
Mirabeau.	0	0	1	0	3	0
Takrits-Seddouk.	3	3	4	0	1	1
Ighzer-Amokran.	8	8	2	2	3	2
Ouled-Rahmoun.	11	10	20	16	1	1
Alma.	10	10	10	2	2	0
	46	43	50	28	15	4
Pourcentage des rechutes : 93,4 0/0.			47,8 0/0.			

RECHERCHES SUR LA COAGULATION DU SANG

Par les Drs Jules BORDET et Octave GENGOU

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

SUR LE POUVOIR COAGULANT DU SÉRUM

(Travail de l'Institut Pasteur de Bruxelles.)

C'est une notion bien acquise que la coagulation du sang est due à ce qu'il se produit du fibrin-ferment aux dépens de la substance mère ou proferment. Cette transformation de la substance génératrice en principe coagulant actif exige l'intervention d'un sel soluble de métal alcalino-terreux, lequel est normalement le calcium. Quant au fibrin-ferment, il est capable de métamorphoser le fibrinogène en fibrine sans le secours des sels de chaux. Le fibrin-ferment d'une part, le calcium de l'autre, sont donc, mais à des titres très divers, des facteurs de la coagulation. L'un est l'agent coagulant proprement dit; l'autre intervient simplement dans la production du premier. Ainsi précisés, les rôles respectifs du calcium et du ferment apparaissent comme très distincts et très tranchés, chacun des facteurs ayant ses attributions particulières. Il semble en d'autres termes que ces deux phases de la coagulation, formation du ferment d'abord, insolubilisation du fibrinogène ensuite, sont bien indépendantes l'une de l'autre, se déroulent sans se confondre, les causes qui les déterminent étant essentiellement différentes. A dire vrai, la démarcation est loin d'être aussi absolue. Nous verrons notamment, dans le présent mémoire, que le fibrin-ferment, ou — pour parler d'une manière moins précise, mais mieux en rapport avec l'imperfection de nos connaissances, — le sérum, ne se borne pas nécessairement à opérer la coagulation du fibrinogène. Il peut intervenir activement dans la production de nouvelles quantités de fibrin-ferment, en accélérant très nettement la transformation, en ferment actif, de la portion de proferment encore inaltérée.

Nous employons couramment, pour les expériences dont l'exposé suit, le plasma salé de lapin; nous en avons parlé dans nos mémoires antérieurs, mais il ne sera pas inutile d'énumérer très brièvement ses propriétés. Ce plasma contient du proferment, lequel exige, pour se transformer en ferment actif capable de provoquer la coagulation, que l'on abaisse fortement, par addition d'une quantité convenable d'eau distillée, la concentration saline [1]. Dans ces conditions, cette transformation réclame néanmoins un certain temps 1/2 heure à 3/4 d'heure environ quand on emploie du plasma salé à 5 0/0 additionné de 4 volumes d'eau distillée); elle ne s'opère qu'en présence de sels de chaux, et est favorisée par le contact de corps solides mouillables, tels que le verre. On peut (en raison de la lenteur relative de cette transformation) prévenir entièrement la coagulation en introduisant de l'oxalate assez longtemps après que le plasma salé a été mélangé à l'eau distillée.

Le plasma salé à 5 0/0 est d'un emploi commode; mais on peut utilement employer aussi le plasma salé à 3 0/0, dont on provoque la coagulation en le mélangeant à 2 volumes d'eau distillée. Le plasma dilué dérivant de plasma salé à 3 0/0 est naturellement moins étendu que celui qu'on obtient en se servant de plasma à 5 0/0; aussi se coagule-t-il plus rapidement; il fournit, en outre, un sérum plus riche en fibrin-ferment.

La forte concentration saline, qui s'oppose à la formation de ferment aux dépens du proferment (et qui permet ainsi au plasma salé à 2, 3, 4 ou 5 0/0 de se maintenir indéfiniment liquide) met également, *mais non d'une manière absolue, obstacle à l'influence coagulante* du ferment sur le fibrinogène. Pour le prouver, ajoutons à du plasma salé à 3 0/0, 2 volumes d'eau distillée; quand la coagulation apparaît, défibrinons; nous obtenons ainsi du sérum riche en fibrin-ferment, capable de coaguler rapidement du plasma dilué oxalaté ou de solidifier en quelques instants du plasma dilué qu'on vient de préparer. A une portion de ce sérum (qui est déjà salé à 1 0/0), ajoutons, d'une solution très concentrée de NaCl, la quantité qu'il faut pour le saler à 2 0/0; salons de la même manière d'autres

1. La coagulation survient le plus rapidement quand on ajoute de l'eau distillée en proportion telle que la teneur en sel soit légèrement inférieure à 1 0/0.

portions du sérum, soit à 3, soit à 4 0/0. A ces sérums diversement salés, ajoutons volumes égaux de différents plasmas de teneurs salines respectivement identiques; on a ainsi des mélanges de plasma et de sérum, salés tous deux, soit à 2, soit à 3 ou 4 0/0. Or, la coagulation s'effectue, mais lentement et avec un retard d'autant plus marqué que la concentration saline est plus forte. Ainsi, dans le mélange où la teneur en sel est de 2 0/0, la coagulation s'effectue au bout de 1 heure environ; elle se montre le lendemain dans celui qui est salé à 3 0/0, le surlendemain seulement dans le liquide dont la concentration est de 4 0/0. Il est superflu d'ajouter que les divers plasmas salés non additionnés de sérum restent indéfiniment liquides.

L'influence retardante du froid sur la coagulation du sang est connue depuis longtemps; elle se manifeste d'une manière frappante pour ce qui concerne le plasma salé dilué par l'eau distillée. Ajoutons à un volume de plasma salé à 3 0/0, 2 volumes d'eau distillée; immédiatement après, versons le plasma dilué dans divers tubes, que nous plongeons, les uns dans l'eau chauffée à 30°, les autres dans de l'eau à 0°; le plasma chauffé se coagule entièrement en 17 minutes, le plasma refroidi, en 1 heure 15. Il est facile de reconnaître que le *froid ralentit la production du fibrin-ferment*. En effet, si, 20 minutes environ après que les plasmas chauffés se sont coagulés entièrement, nous ajoutons 1 0/00 d'oxalate sodique aux plasmas refroidis qui à ce moment sont encore parfaitement liquides, ceux-ci ne se coagulent jamais, même si on les expose ensuite à la température de 30°. D'autre part, l'abaissement de la température *nuit également à l'influence coagulante* du ferment : Procurons-nous du sérum par coagulation spontanée et défibrination de plasma dilué. Dès qu'il est obtenu, oxalatons-le à 1 0/00; préparons alors des mélanges, en volumes égaux, de ce sérum oxalaté et de plasma dilué également oxalaté à 1 0/00. Certains mélanges sont portés à 30°; d'autres, refroidis vers 0°. Dans ceux-ci la coagulation exige 20 minutes; elle s'opère en 5 minutes environ dans les mélanges chauffés.

L'emploi du plasma salé présente incontestablement de réels avantages pour l'étude de la coagulation du sang. Le fait que le plasma salé exige un temps assez long pour se coaguler lors-

qu'on le dilue par l'eau distillée est notamment une circonstance très favorable à l'étude : on a le temps de faire intervenir, entre le moment de la dilution et celui où la prise en caillot doit apparaître, certaines influences susceptibles soit d'accélérer, soit de ralentir ou d'enrayer la coagulation, et dont on peut commodément estimer le pouvoir. Il convient de remarquer en outre, non seulement que l'on peut, en se servant du même plasma salé, instituer de nombreux essais, mais surtout qu'il est toujours possible de reproduire à n'importe quel moment, puisqu'on utilise toujours le même échantillon de plasma salé, des liquides (plasmas dilués, sérums) absolument identiques à ceux qui ont fait l'objet d'expériences antérieures. Rien de plus simple, par exemple, que d'obtenir du sérum et du plasma aussi rigoureusement comparables que possible, avec cette différence unique que la coagulation s'est opérée dans l'un des liquides, n'a point apparu dans l'autre : il suffit de diluer par l'eau distillée, de la même façon, mais à des moments différents, le même plasma salé. Au reste, parmi les plasmas privés de cellules et incoagulables que l'on peut obtenir, le plasma salé est le plus comparable au sang naturel, car, lorsqu'il est convenablement dilué, le sel qu'il contient ne représente plus une influence anormale.

* * *

Un phénomène sur lequel nous devons, pour la clarté de ce qui va suivre, attirer spécialement l'attention, est celui de l'affaiblissement rapide que subit le pouvoir coagulant du sérum conservé pendant quelque temps. Ce fait, observé par Schmidt et d'autres expérimentateurs à propos du sérum naturel ou de solutions de fibrin-ferment, se constate avec beaucoup d'évidence lorsqu'on se sert de sérum obtenu par dilution et coagulation spontanée du plasma salé, *et qu'on emploie comme réactif de la puissance coagulante, le plasma oxalaté.* Sans doute, c'est en partie parce qu'ils employaient des sérums un peu vieillis, que certains auteurs ont considéré la coagulation en milieu oxalaté comme étant toujours lente et pénible; en réalité, le sérum oxalaté à 1 0/00 peut, lorsqu'il est très frais, coaguler en quelques instants le plasma dilué oxalaté. Voici quelques indications sur l'affaiblissement spontané du sérum :

On prépare du plasma dilué oxalaté en ajoutant un volume

de solution de NaCl à 1 0/0 contenant 1 0/0 d'oxalate sodique, à neuf volumes de plasma dilué qu'on vient d'obtenir (par mélange de 4 parties d'eau distillée, et d'une partie de plasma salé à 5 0/0.) On distribue en outre, dans divers tubes, 1/10 de c. c. de la solution d'oxalate sodique à 1 0/0. On dilue d'autre part du plasma salé dans de l'eau distillée pour obtenir du sérum; quand la coagulation s'établit (au bout de 40 minutes environ) on défibrine pendant quelques minutes, jusqu'à ce que la totalité de la fibrine soit extraite (on a soin, bien entendu, de s'assurer que le sérum formé ne se recoagule plus ultérieurement). A ce moment (7 à 8 minutes après que le plasma s'est solidifié), transportons 9/10 de c. c. du sérum dans un des tubes contenant 1/10 de c. c. d'oxalate; laissons le contact avec l'agent décalcifiant se prolonger pendant 7 minutes, puis ajoutons 1 c. c. de plasma oxalaté. Le mélange se prend en masse au bout de 3 minutes à peine; le sérum tout récemment obtenu est donc extrêmement actif. Répétons l'expérience 1/4 d'heure plus tard : le sérum s'est déjà très nettement affaibli; il exige 1/2 heure pour coaguler le plasma oxalaté. Si nous éprouvons le pouvoir du sérum 3/4 d'heure après qu'il a été préparé, l'effet coagulant ne s'observe qu'au bout de 50 minutes de contact. Le sérum vieux, soit de 2 h. 1/2, soit de 7 heures (et oxalaté, bien entendu, comme nous venons de l'indiquer) coagule volume égal de plasma oxalaté, soit en 1 h. 1/2, soit en 3 h. 1/2. L'affaiblissement du sérum s'accuse encore ultérieurement.

Le pouvoir coagulant du fibrin-ferment s'atténue donc très rapidement; cette dégradation est parfois tellement brusque que la conservation pendant 10 minutes d'un sérum fraîchement préparé peut suffire à décupler le laps de temps qu'il exige pour coaguler volume égal de plasma oxalaté [1]. Quant au plasma oxalaté, ses propriétés ne sont guère influencées par la conservation ; préparé depuis quelques minutes ou depuis plusieurs heures, il se laisse toujours coaguler rapidement par du sérum frais, lentement par du sérum vieilli.

Un autre fait ressort encore de l'expérience que nous venons de relater. Lorsqu'on dilue du plasma salé dans de l'eau dis-

1. Il va sans dire qu'avant d'être mélangé au plasma oxalaté, le sérum est toujours oxalaté de la même manière, et pendant le même nombre de minutes; au reste, la précipitation de la chaux dans le plasma dilué ou le sérum oxalatés à 1 0/00 s'accomplit rapidement.

tillée; le fibrin-ferment — et corrélativement la coagulation — ne commencent à apparaître qu'au bout d'un temps assez prolongé; mais si alors on défibrine, le sérum qu'on obtient atteint très rapidement le maximum de son pouvoir coagulant; peu d'instants après que la totalité de la fibrine s'est séparée, le sérum se montre aussi actif que possible, et bientôt après s'affaiblit graduellement. Dans ces conditions, la production du ferment s'effectue donc, si l'on peut s'exprimer ainsi, d'une manière explosive. Il n'en va pas de même, comme l'a montré M. Arthus (dont nous pouvons confirmer les observations) pour ce qui concerne le sang normal, fraîchement recueilli, qui se coagule et que l'on défibrine. Dans ce sang normal, la production du ferment est plus traînante; elle se poursuit pendant un temps assez prolongé après la coagulation; peut-être la mise en liberté, par les cellules, du proferment, ne s'opère-t-elle que graduellement [1].

L'affaiblissement spontané que subit, dans son énergie coagulante, le sérum provenant de plasma salé et que l'on conserve, donne lieu à une remarque sur laquelle il convient d'attirer l'attention et que nous utiliserons plus loin. En diluant par portions, de la même manière, mais à des moments différents, un même plasma salé, on se procure des sérums de constitution toujours identique, et dont le pouvoir coagulant à l'égard du plasma oxalaté ne dépend que du temps qui s'est écoulé depuis qu'on les a obtenus. En éprouvant l'activité de ces divers échantillons de sérum, on peut en conséquence reconnaître si le fibrin-ferment soumis à l'essai est de production récente ou s'est formé depuis longtemps déjà.

***

Accélération de la production du fibrin-ferment sous l'influence du sérum.

Nous avons estimé jusqu'ici le pouvoir coagulant du sérum en prenant, comme réactif, le plasma oxalaté. Mais on peut recourir à un autre moyen. On peut faire agir le sérum sur du

1. Chose assez curieuse, le sang défibriné oxalaté ne nous a point paru posséder, à aucun moment, à l'égard du plasma oxalaté, un pouvoir coagulant égal à celui du sérum frais provenant de plasma salé dilué; il exige généralement, pour coaguler un volume égal de ce plasma, 20 minutes au moins. Il y a là, dans la comparaison du sang défibriné et du sérum de plasma salé et dilué, matière à nouvelles recherches.

plasma dilué, non oxalaté, qu'on vient de préparer; dans ces conditions, celui-ci se solidifie très rapidement. Il est logique de prévoir que du sérum tout récemment obtenu (et qui, oxalaté, coagule rapidement le plasma oxalaté), se montrera capable d'accélérer beaucoup la coagulation du plasma dilué; cette prévision est confirmée par l'expérience. Mais il semble également rationnel d'admettre de même que du sérum conservé pendant un jour ou deux, et dont l'énergie coagulante à l'égard du plasma oxalaté s'est considérablement atténuée, ne hâtera plus que dans une faible mesure la prise en caillot du plasma salé qui depuis quelques instants est additionné de la quantité voulue d'eau distillée. Or, l'expérience dément cette supposition. Le sérum, en qui s'altère si vite le pouvoir de provoquer la coagulation en milieu oxalaté, garde intacte, pendant très longtemps, la faculté d'accélérer d'une manière frappante la solidification du plasma dilué non décalcifié [1]. A quoi tient cette discordance?

On pourrait imaginer qu'au sein de liquides contenant des sels calciques (tels que le plasma dilué) le passage du fibrinogène à l'état de fibrine s'opère très facilement, qu'il suffit, pour cela, de l'amorcer simplement en faisant intervenir une influence même faible (telle que celle d'un sérum vieilli), et que dès lors la transformation se généralise et se propage d'elle-même à toutes lès molécules du fibrinogène, le phénomène devenant comparable à celui de la cristallisation dans une solution sursaturée. En réalité, on n'observe point de pareille contagion de la coagulation. Prenons un bloc allongé de paraffine, grattons-en la surface suivant une ligne droite de manière à y creuser une gouttière longue et étroite; remplissons ce canal de plasma dilué préparé quelques instants auparavant; au contact de la paraffine, on le sait, la coagulation spontanée exige un temps extrêmement prolongé. Versons doucement dans le plasma, à l'une des extrémités du canal, deux ou trois gouttes de sérum qu'on a eu soin de teindre légèrement en bleu; si l'on opère sans secousses, le mélange ne s'établit que dans une zone très peu étendue, où la coagulation apparaît du reste en quelques instants. Mais la solidification ne se propage que très lentement,

1. Peut-être cette propriété s'affaiblit-elle quelque peu, mais en tous cas d'une manière presque inappréciable; le sérum conservé pendant quelques jours la présente encore à un haut degré.

et ne s'avance guère plus que ne progresse, par diffusion, la teinte bleue du sérum. La coagulation de la masse entière réclame le mélange intime de ce dernier et du plasma.

Sans insister davantage sur toutes les interprétations hypothétiques qui pourraient venir à l'esprit, énonçons immédiatement l'explication réelle de ce fait singulier, qu'un sérum préparé depuis plusieurs heures, qui, oxalaté, n'impressionne plus le plasma décalcifié qu'avec très peu d'énergie, convertit cependant, en peu d'instants, le plasma dilué normal en un bloc solide. Dans ces conditions, la vraie cause de la coagulation rapide ne réside pas dans l'action directe et immédiate du sérum sur le fibrinogène; elle consiste dans l'influence exercée par ce sérum sur le proferment du plasma. Nous le savons, le proferment du plasma dilué et non décalcifié est susceptible de se transformer, spontanément et sans le secours d'aucune addition de substance quelconque, en fibrin-ferment actif. Mais si l'on n'intervient point, cette transformation est lente. Elle s'accomplit au contraire avec beaucoup de rapidité si l'on ajoute au plasma qu'on vient d'obtenir une quantité même faible de sérum. Ce qui coagule alors le fibrinogène, ce n'est pas le fibrin-ferment apporté par le sérum ; c'est celui qui se forme extemporanément, aux dépens du proferment propre au plasma lui-même : le sérum agit donc, principalement, en excitant la production du ferment. Cette propriété « excitoproductrice » est, remarquons-le, fort stable : le sérum la conserve beaucoup plus longtemps qu'il ne garde le pouvoir d'opérer directement en milieu oxalaté la conversion du fibrinogène en fibrine. Ajoutons immédiatement que l'influence « excitoproductrice » du sérum n'est efficace qu'en présence de sels solubles de calcium.

On met facilement en évidence la propriété que possède le sérum d'accélérer la métamorphose du proferment, en tirant profit de ce fait que du fibrin-ferment conservé depuis un temps assez prolongé et oxalaté, ne coagule que fort lentement le plasma oxalaté, tandis que du fibrin-ferment tout récemment produit et oxalaté peut le solidifier en quelques minutes.

Commençons par nous procurer du sérum par coagulation spontanée et défibrination d'un mélange de 4 parties d'eau distillée et d'une partie de plasma salé à 5 0/0. Attendons un certain temps (4 ou 5 heures par exemple ; au reste, l'expérience

donne les mêmes résultats si l'on se sert de sérum âgé d'un jour ou davantage), au bout duquel le sérum, oxalaté à 1 0/00, ne coagule plus que fort lentement (2 ou 3 heures environ) volume égal de plasma dilué oxalaté également à 1 0/00. Appelons ce sérum vieilli, sérum V.

A ce moment, versons dans un tube A, 4/10 de c. c. de sérum V, et dans un tube B, 4/10 de c. c. de la solution de NaCl à 1 0/0 ; (on peut aussi mettre dans ce tube B, au lieu de cette solution, 4/10 de c. c. de sérum V rendu inactif par un chauffage préalable à 58°). Préparons ensuite une certaine quantité de plasma dilué par mélange d'un volume de plasma salé à 5 0/0 (identique à celui dont on s'est servi pour obtenir le sérum V), et de quatre volumes d'eau distillée. Dès qu'il est obtenu, versons-en 4 c. c. dans le tube A et dans le tube B.

La coagulation s'effectue très rapidement, en 3 ou 4 minutes, dans le tube A; dès qu'elle se montre, défibrinons au moyen d'une baguette de verre; pour que tout soit comparable, pratiquons la même opération sur le liquide B (il ne s'agit, ici, que d'un simulacre de défibrination, car ce liquide ne se coagule pas à ce moment). Attendons encore quelques minutes, pour être certains que le sérum obtenu aux dépens du liquide A ne se coagule plus (ce dont on s'assure d'ailleurs encore ultérieurement); appelons ce sérum récemment formé, sérum N; quant au plasma dilué du tube B, il ne s'est point modifié, car une dizaine de minutes seulement s'est écoulée depuis que le plasma salé a été mêlé à l'eau distillée.

Prélevons alors 9/10 de c. c. du sérum N, que nous versons dans un tube C contenant déjà 1/10 de c. c. de solution d'oxalate sodique à 1 0/0; transportons de même, quelques instants après, 9/10 de c. c. du liquide B dans un tube D contenant la même dose d'oxalate; enfin, mélangeons encore dans un tube E des doses correspondantes d'oxalate et de sérum V (identique à celui dont on s'est servi au début de l'expérience).

Laissons, dans les tubes C, D, E, le contact avec l'oxalate se prolonger pendant le même temps (5 ou 7 minutes par exemple) au bout duquel nous versons, dans chacun de ces 3 tubes, 1 c. c. de plasma dilué oxalaté à 1 0/00 (préparé encore aux dépens de la même provision de plasma salé à 5 0/0). Le contenu du tube C se coagule en bloc en 3 minutes environ ; celui du tube D reste

indéfiniment liquide ; celui du tube E ne se coagule que très lentement, au bout de 2 à 3 heures par exemple.

Mais bientôt le liquide B subit la coagulation spontanée [1]; défibrinons-le et éprouvons le pouvoir coagulant de ce nouveau sérum (on l'oxalate comme il a été dit précédemment) sur le plasma oxalaté ; en même temps, recommençons le même essai pour ce qui concerne le sérum N. Nous constatons que ce dernier s'est déjà affaibli (en raison de la conservation) et que la coagulation, sous son influence, du plasma oxalaté, exige environ 15 minutes; actuellement, le sérum le plus actif, capable de coaguler le plasma oxalaté en trois minutes environ, est celui qui provient du tube B, et qui est donc le plus récemment obtenu ; il s'affaiblit du reste ultérieurement comme le fait le sérum N.

L'expérience ci-dessus résumée démontre nettement que l'addition d'un peu de sérum à du plasma dilué a comme conséquence la transformation rapide en ferment du proferment du plasma, transformation qui ne se serait accomplie sans le secours du sérum qu'au bout d'un temps beaucoup plus long. Du fibrinferment de nouvelle formation, et par conséquent très actif à l'égard du plasma oxalaté, apparaît en abondance; à ce moment, le même plasma, non additionné de sérum, ne renferme encore aucune trace de fibrin-ferment.

En d'autres termes, du plasma dilué auquel on ajoute un peu de sérum V, et qui se coagule, fournit, en un laps de temps bien inférieur à celui qu'aurait exigé, en l'absence du sérum, la transformation du proferment, un sérum N qu'on ne saurait considérer comme une simple dilution du sérum V dans un liquide inerte. Les deux fibrin-ferments, celui qu'apporte le sérum V, celui qui vient de se former, se distinguent l'un de l'autre par leur âge, c'est-à-dire par leur pouvoir coagulant en milieu oxalaté, ainsi qu'en témoigne la comparaison des tubes C et E.

Ajoutons qu'il se produit, sous l'influence « excito-productrice » du sérum V, autant de fibrin-ferment qu'il s'en forme normalement dans la coagulation spontanée.

En effet, le sérum N se montre, lorsqu'il est bien frais, tout

1. Rappelons que la coagulation spontanée du plasma salé à 5 0/0 dilué dans 4 parties d'eau, exige environ une demi-heure, à la température du laboratoire.

aussi actif que le sérum, également frais, résultant de la coagulation spontanée du liquide B. Il est fort vraisemblable que la transformation affecte, dans l'un et l'autre cas, la totalité du proferment.

L'apparition, dans le plasma dilué, du fibrin-ferment grâce à « l'excito-production » (désignons ainsi, pour abréger, l'accélération imprimée par le sérum à la métamorphose de la substance-mère en ferment actif), bien que rapide, n'est cependant pas instantanée, surtout lorsque la dose de sérum mélangée au plasma est relativement faible [1].

Si, à 1 c. c. de plasma dilué, tout récemment obtenu, on ajoute 1/10 de c. c. de sérum V, on peut s'opposer à la production du ferment, en introduisant immédiatement dans le mélange 1/10 de c. c. de solution d'oxalate à 1 0/0 ; la coagulation ne s'effectue alors qu'au bout d'un temps très long (1 à 2 jours par exemple) sous l'influence de la trace de fibrin-ferment apportée par le sérum V. Pratiquée 1 à 2 minutes, parfois même quelques secondes plus tard, l'introduction de l'oxalate reste sans effet, la solidification s'effectue sans délai, du fibrin-ferment actif venant déjà d'apparaître.

Cette expérience nous montre en même temps que la présence de sels calciques est indispensable à la manifestation de l'influence « excito-productrice » du sérum. Ce fait résulte déjà, à l'évidence, de ce que nous savons de la coagulation en milieu oxalaté. Du sérum un peu ancien ne coagule que très lentement le plasma oxalaté. Il est clair que s'il pouvait y faire naître de nouvelles quantités de fibrin-ferment, la coagulation surviendrait très vite, le ferment récemment produit ayant précisément ce caractère de solidifier rapidement le fibrinogène décalcifié.

Mais la nécessité des sels de chaux pour « l'excito-production » peut se démontrer expérimentalement d'une manière plus tangible. On peut, en effet, ajouter du sérum à du plasma dilué préalablement décalcifié, et constater que « l'excito-production » ne s'effectue que si l'on a soin d'additionner le mélange d'une trace de sel calcique. Voici le détail de l'expérience :

1. La propriété « excito-productrice » ne se manifeste plus d'une manière perceptible lorsque la proportion de sérum ajouté au plasma dilué récemment obtenu est trop réduite ; c'est ainsi que le sérum n'accélère pas notablement la coagulation lorsqu'on en verse 1 volume dans 100 volumes de plasma dilué.

Décalcifions du plasma salé en ajoutant à 6 parties de ce plasma une partie de solution de Na Cl à 1 0/0 renfermant 0,5 0/0 d'oxalate sodique. Au bout d'un temps de contact assez prolongé, versons dans le mélange 24 parties d'eau distillée ; le plasma dilué ainsi obtenu ne se coagule jamais spontanément[1].

Introduisons d'autre part, dans deux tubes A et B, 6/10 de c. c. de sérum V obtenu 24 heures auparavant par coagulation spontanée de plasma dilué normal ; versons en outre, dans un tube C, 6/10 de c. c. de ce même sérum V, chauffé au préalable vers 60° pendant une demi-heure.

Ajoutons ensuite, aux 3 tubes, 1,8 c. c. du plasma dilué incoagulable qu'on vient de préparer. Immédiatement après, additionnons successivement, le tube B de 2/10 de c. c. d'une solution de NaCl à 1 0/0, les tubes C et A de 2/10 de c. c. d'une solution de NaCl à 1 0/0 contenant en outre 1 0/00 de chlorure calcique[2].

Aussitôt après que ces mélanges sont effectués, et avant que « l'excito-production » n'ait eu le temps de s'opérer dans le tube A, on prélève 9/10 de c. c. de chacun des liquides A, B, C, qu'on transporte rapidement dans 3 tubes nouveaux D, E, F, contenant déjà 1/10 de c. c. de la solution d'oxalate sodique à 1 0/0 ; il se produit un trouble bien net d'oxalate calcique, résultant de la précipitation complète de la chaux, dans les 2 tubes qui ont reçu les liquides A et C ; laissons le contact avec l'oxalate se prolonger, dans chaque tube, pendant 8 minutes, puis ajoutons à ces 3 tubes D, E, F, 1 c. c. de plasma dilué oxalaté à 1 0/00.

On constate ultérieurement que la coagulation n'apparaît jamais dans le tube où le plasma oxalaté est mêlé au liquide provenant du tube C ; elle ne s'opère qu'au bout de 1 à 2 jours, et encore incomplètement, dans les 2 tubes qui ont reçu soit du liquide A, soit du liquide B (lesquels renferment un peu de fibrinferment ancien appartenant au sérum V).

Mais, sur ces entrefaites, une dizaine de minutes après l'introduction de la trace de sel calcique dans les tubes C et A, la coagulation apparaît dans ce dernier (A), sous l'influence combi-

1. L'excès d'oxalate que renferme ce plasma est léger, et sa concentration devient très faible en raison de la forte dilution par l'eau distillée.

2. Les liquides A et C, pont le volume total est de 2,6 c. c. sont donc calcifiés à 1/13 p. 1000, c'est-à-dire à raison d'environ 8 milligrammes pour 100 grammes.

née de la chaux et du sérum V non chauffé. On le défibrine, tout en imprimant des mouvements semblables aux contenus des tubes B et C. Le tube A fournit ainsi du sérum, B et C ne se coagulant pas à ce moment. B, en effet, contient bien du sérum V non chauffé, mais point de chaux ; C renferme de la chaux, mais ne possède que du sérum V chauffé.

Transportons alors 9/10 de c. c. de sérum A dans un tube AA contenant déjà 1/10 de c. c. d'oxalate à 1 0/0 ; oxalatons de même (tube BB) 9/10 de c. c. de liquide B, et 9/10 de c. c. (tube CC) de liquide C. Au bout de 8 minutes de contact avec l'oxalate, ajoutons aux 3 tubes AA, BB, CC, 1 c. c. de plasma oxalaté dilué. La coagulation survient en quelques minutes dans le tube AA, n'apparaît jamais dans le tube CC, s'opère incomplètement dans BB, au bout de 1 à 2 jours.

Il reste, après la confection des mélanges AA, BB, CC, un peu de liquide non encore coagulé dans les tubes B et C. Le contenu du tube C (où le plasma a été additionné de $CaCl^2$ et de sérum chauffé) se coagule 50 minutes après le moment auquel on a introduit la trace de sel calcique. Le liquide du tube B (plasma et sérum V, mais pas de chaux) se solidifie en 12 heures environ.

On le voit, il est indispensable, pour faire apparaître rapidement, par « excito-production », le fibrin-ferment dans du plasma dilué tout récemment préparé, de faire intervenir simultanément le sel calcique et le sérum.

Ajoutons que, dans ces conditions, le ferment se produit tout aussi activement si le liquide est maintenu en vase paraffiné que s'il est contenu dans un verre ordinaire.

Notons encore, pour compléter ces données, que les expériences de ce genre donnent les mêmes résultats si l'on emploie, pour accélérer la formation du ferment dans le plasma dilué récemment obtenu, non pas du sérum provenant de plasma salé et dilué, mais du sang normal défibriné. Celui-ci, comme le sérum de plasma dilué, garde pendant longtemps sa propriété « excito-productrice ».

Signalons encore, sans insister sur les détails, quelques essais relatifs à l'action d'un chauffage modéré et peu prolongé sur le plasma salé qu'on a, quelques instants auparavant, dilué dans la quantité voulue d'eau distillée. On le sait, le fibri-

nogène est légèrement plus sensible à la chaleur que ne l'est le proferment.

Du plasma salé à 5 0/0, additionné de 4 parties d'eau, et chauffé ensuite pendant 10 minutes vers 53°, se coagule encore; il ne se coagule plus si la température s'est élevée, pendant le même temps, à 54° environ, et le liquide devient légèrement opalescent. On se procure ainsi du plasma incoagulable, mais dans lequel, le proferment n'étant pas détruit, la marche de la production du fibrin-ferment suit à peu près son cours habituel.

Au bout de 45 minutes environ, le liquide acquiert (sauf si on le décalcifie par l'oxalate un peu après qu'il a été chauffé), la propriété de coaguler le plasma oxalaté, d'accélerer la production du ferment dans le plasma dilué normal récemment obtenu.

On peut même démontrer, en se servant de plasma chauffé de la sorte, l'influence empêchante de la paraffine sur la production spontanée du ferment.

Mais si l'on chauffe à 56° ou un peu au-dessus, le proferment s'altère, et le plasma devient incapable de fournir ultérieurement du ferment. Au reste, cette température est aussi, très approximativement, celle qui abolit l'activité du fibrin-ferment du sérum.

*
* *

La substance qui confère au sérum ou au sang défibriné le pouvoir d'accélérer la production du fibrin-ferment dans le plasma dilué, est-elle bien identique au fibrin-ferment lui-même, c'est-à-dire au principe qui, même en l'absence de sels de chaux, convertit le fibrinogène en fibrine?

Wooldridge avait signalé que l'addition au sang de divers extraits d'organes, en accélère la coagulation. Delezenne, à propos du sang d'oiseau, Spangaro ensuite pour ce qui concerne le sang des mammifères, ont montré que le contact avec la plaie, le mélange avec le suc de tissus, favorisent d'une manière très accusée la coagulation du sang.

Mais il ne s'agit point, dans ces recherches, de substances propres au sérum lui-même. Bien au contraire, Arthus, qui a repris cette question, déduit de ses expériences qu'il n'y a point de fibrin-ferment dans le suc de plaie ou dans l'extrait d'organes;

la substance active de ces liquides hâterait la coagulation du sang en accélérant la formation du fibrin-ferment, mais cela sans être elle-même ni du ferment ni du proferment; on doit admettre, d'après Arthus, que les macérations d'organes contiennent des substances qui sont des excitants chimiques de la sécrétion fibrin-ferment des globules blancs.

Ce ne sont, certes, point des substances de cette catégorie qui interviennent dans les expériences que nous avons relatées. Dans celles-ci, c'est bien le liquide sanguin lui-même, obtenu sous forme de plasma salé que l'on dilue ensuite, et non un suc étranger de plaie ou d'organes, qui fournit le principe actif.

Bien plus, ce principe, susceptible de hâter considérablement la métamorphose du proferment, ne se rencontre pas dans le plasma salé que l'on vient de diluer dans de l'eau distillée.

Le plasma dilué, que l'on abandonne à lui-même et qui exige un temps prolongé pour se prendre spontanément en caillot, doit, pour hâter l'apparition du ferment dans une nouvelle portion de plasma dilué, s'être lui-même coagulé, s'être converti en sérum; en d'autres termes, il doit lui-même avoir été le siège de la production du ferment. La matière douée de la propriété « excito-productrice » apparaît donc en même temps que le fibrin-ferment.

A vrai dire, il semble bien que les deux principes ne sont en réalité qu'une seule et même matière; si l'on se range à cette opinion, il faut observer toutefois que l'une des propriétés du fibrin-ferment, celle de coaguler directement le fibrinogène (même en l'absence de chaux) résiste moins à la conservation que la seconde, celle d'accélérer la transformation du proferment en ferment actif (propriété « excito-productrice »).

Cette notion de l'unicité de la substance coagulante et « excito-productrice » est en harmonie avec les constatations relatives à l'influence de la chaleur sur le sérum provenant de plasma dilué. Le chauffage de ce sérum, pendant une dizaine de minutes, vers 56°, abolit à la fois les deux propriétés. Il est superflu de faire remarquer toutefois que l'attribution, à un seul et même principe, de deux propriétés distinctes, ne saurait s'appuyer sur des preuves absolues et vraiment irréfutables, quand il s'agit de matières dont la nature intime reste très mystérieuse.

***

Le fait que le sérum hâte la transformation du proferment comporte quelques conséquences que nous signalerons brièvement.

Dans le plasma salé étendu d'eau distillée, le fibrin-ferment ne commence à apparaître qu'au bout d'un temps prolongé. Mais si l'on défibrine au moment où la coagulation débute contre la paroi, la quantité de ferment s'accroît très rapidement et atteint bientôt son maximum.

On le conçoit, les premières traces de sérum formé interviennent alors pour généraliser la transformation à la totalité du proferment; telle est bien, semble-t-il, l'explication de l'apparition « explosive » du ferment dans le plasma défibriné.

Lorsqu'on mélange un peu de sérum à du plasma contenant du proferment et de la chaux (tel que le plasma dilué), la rapidité de « l'excito-production » est naturellement en rapport avec la quantité de sérum mis en jeu. Mais comme le fibrin-ferment se multiplie en quelque sorte grâce à la métamorphose du proferment, la vitesse et l'intégralité de la coagulation ne dépendent pas aussi étroitement de la dose de sérum que si l'on opère en milieu décalcifié, où la production de nouveau ferment ne peut s'opérer.

La coagulation du plasma oxalaté est très lente et peut même rester incomplète, lorsqu'on n'ajoute à ce liquide qu'une quantité faible de sérum oxalaté.

Dans le même ordre d'idées, M. Arthus a d'ailleurs fait voir antérieurement que le plasma fluoré peut être utilisé comme réactif quantitatif du fibrin-ferment.

D'autre part, le sérum que fournit la coagulation de plasma oxalaté sous l'influence de sérum oxalaté, ne jouit lui-même, à l'égard d'une seconde portion de plasma oxalaté, que d'un pouvoir coagulant relativement faible : il ne représente en effet qu'une dilution du sérum primitif, aucune trace de ferment nouveau n'ayant pu se produire.

Au contraire, le sérum B, qu'on obtient en quelques instants en ajoutant à du plasma dilué, récemment préparé, un peu de sérum A, coagule très rapidement à son tour, en y hâtant l'apparition du ferment, une nouvelle quantité de plasma dilué, transforme par conséquent ce liquide en sérum C, lequel pos-

sède des caractères identiques à ceux des sérums précédents, et ainsi de suite indéfiniment.

C'est vraisemblablement grâce encore à la propriété « excito-productrice » du sérum que s'explique un fait fréquemment observé dans nos expériences sur la coagulation en milieu oxalaté.

Nous avons dit antérieurement que le sérum provenant de plasma salé dilué, lorsqu'on l'a conservé pendant une ou quelques heures et qu'on l'oxalate à 1 0/00, ne coagule plus que lentement volume égal de plasma semblablement oxalaté.

Mais la coagulation survient beaucoup plus rapidement si l'on ajoute, à du plasma oxalaté, non plus à 1 0/00, mais à 2 0/00, volume égal d'un pareil sérum non oxalaté au préalable; et cependant, dans ces conditions, la teneur du mélange en oxalate est encore de 1 0/00.

Par exemple, au lieu d'ajouter d'abord à 9/10 de c. c. d'un tel sérum (une ou deux heures après qu'on l'a obtenu par coagulation spontanée de plasma salé à 3 0/0 et dilué), 1/10 de c. c. de solution d'oxalate à 1 0/0, puis de verser dans le tube 9/10 de c. c. de plasma dilué oxalaté à 1 0/00, nous pouvons tout aussi bien introduire dans 9/10 de c. c. de ce plasma oxalaté, 1/10 de c. c. de la solution d'oxalate puis ajouter au mélange 9/10 de c. c. de sérum non oxalaté.

Or, ces différences dans la manière d'opérer influent considérablement sur la vitesse de la coagulation; dans le second cas, celle-ci s'effectue généralement en quelques minutes; dans le premier, elle exige une heure au moins. Il est probable que dans la seconde manière de faire, les sels calciques apportés par le sérum ne sont pas instantanément précipités d'une manière complète par l'oxalate, et permettent ainsi au sérum de transformer en ferment actif tout au moins une petite fraction du proferment propre au plasma oxalaté.

A vrai dire, nous ne donnons pas cette explication comme définitive; il nous a paru en effet que d'autres causes sur lesquelles nous ne sommes pas encore suffisamment renseignés interviennent également dans le phénomène.

*
* *

CONCLUSIONS

1° A côté du pouvoir de coaguler le fibrinogène, le sérum ou le sang défibriné) possède encore celui d'accélérer considérablement, dans le plasma dilué auquel on l'additionne, la production du fibrin-ferment aux dépens du proferment propre à ce plasma.

La première propriété (celle de transformer le fibrinogène en fibrine) peut, on le sait, s'exercer même en l'absence de chaux; la seconde (celle d'exciter la production du ferment) exige pour se manifester la présence de sels calciques.

2° Le principe doué de ce pouvoir d'exciter la production du ferment (propriété « excito-productrice) ne se rencontre pas dans le plasma salé qu'on vient de diluer dans l'eau distillée; il apparaît, de même que le fibrin-ferment, lors de la coagulation; en d'autres termes, il est propre au sérum, et doit probablement être considéré comme identique au fibrin-ferment lui-même. Comme ce dernier, il est détruit par le chauffage à une température voisine de 56°.

3° La propriété « excito-productrice » explique diverses particularités du phénomène de la coagulation, et notamment le fait que la teneur du plasma dilué en fibrin-ferment, nulle pendant un temps assez prolongé, devient très rapidement considérable lorsqu'on défibrine le liquide au moment où il commence à se coaguler.

4° Dans le sérum que l'on conserve, le pouvoir de coaguler le fibrinogène en milieu oxalaté s'atténue plus manifestement et plus rapidement que la « propriété excito-productrice ».

5° Le froid retarde la coagulation du plasma salé et dilué; il agit d'abord en ralentissant la transformation spontanée du proferment en ferment actif, ensuite en déprimant l'activité de ce ferment.

6° La forte concentration saline, qui s'oppose d'une manière absolue, dans le plasma salé, à la production du ferment, contrarie aussi, mais avec moins d'énergie, l'influence coagulante du fibrin-ferment sur le fibrinogène.

ACTION DE LA LACCASE SUR LE GAÏACOL

PAR M. GABRIEL BERTRAND

J'ai signalé autrefois l'existence d'une relation étroite entre la constitution des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase : d'une manière générale, les composés nettement oxydables sont ceux qui, appartenant à la série cyclique, possèdent au moins deux des groupements OH ou NH^2 dans leur noyau, et dans lesquels ces groupements sont situés, les uns par rapport aux autres, soit en position ortho, soit surtout en position para [1].

Cette relation m'a permis non seulement de caractériser la laccase, mais aussi de découvrir la tyrosinase, qui s'attaque à des composés d'une constitution différente. En outre, la même relation a déjà servi à prévoir, dans une certaine mesure, la constitution de plusieurs principes naturels, comme les aloïnes, le bolétol, etc., d'après la façon dont ils se comportent avec la laccase.

Après avoir déterminé, au moins d'une manière générale, quels sont les corps susceptibles de subir l'action des ferments oxydants, il fallait étudier une nouvelle question, très importante au point de vue du rôle que ces ferments peuvent jouer dans l'organisme : c'est la constitution chimique des produits engendrés au cours de l'oxydation.

Lorsqu'on opère avec l'hydroquinone, que j'avais prise tout d'abord à cause de la netteté de la réaction, il y a départ des deux hydrogènes phénoliques et production de quinone [2].

Mais le phénomène est en général plus compliqué. Une proportion notable du carbone peut même être séparée à l'état d'acide carbonique : par exemple dans le cas du pyrogallol. Ce

1. *C. R. Acad. des Sciences*, t. CXXII, p. 1132-1135 (1896) et *Bull. Soc. Chimiq.* 3e série, t. XV, p. 791-793 (1896).

2. En pratique, celle-ci se combine, molécule à molécule, avec une partie de l'hydroquinone non encore oxydée, et on voit apparaître dans le liquide de beaux cristaux mordorés de quinhydrone.

corps donne, comme on sait, un produit cristallisé, la purpurogalline, dont la constitution n'a pu être établie d'une façon certaine.

Aussi n'est-il pas sans intérêt de revenir en détail sur quelques-unes des réactions oxydasiques dont, à l'origine, j'avais pu indiquer seulement le caractère général. Je rapporterai aujourd'hui les résultats que j'ai obtenus en étudiant l'action de la laccase sur le gaïacol.

En faisant réagir le suc de divers champignons sur une solution aqueuse de gaïacol, M, Bourquelot a vu le liquide se colorer en rouge orangé, puis laisser déposer un précipité rouge [1]. Mais, comme je l'ai démontré, le suc de champignons renferme à la fois de la laccase et de la tyrosinase ; on ne peut savoir, *a priori*, laquelle de ces deux oxydases intervient dans la transformation du gaïacol, ce corps étant, comme on sait, l'éther monométhylique de la pyrocatéchine : $C^6H^4.OH.OCH^3$. Il est même permis de se demander, d'après la richesse des champignons en diastases de toutes sortes, s'il n'y a pas là autre chose qu'une simple action oxydasique, s'il n'y a pas en même temps une transformation accessoire.

Je me suis assuré, à l'aide de laccase type, provenant de latex de l'arbre à laque, que c'est uniquement à cette oxydase qu'on doit rapporter la transformation du gaïacol par le suc de champignons. Le gaïacol devient, par suite, un véritable réactif de la laccase.

Ce point acquis, j'ai préparé une certaine quantité du produit d'oxydation pour en déterminer les propriétés et la constitution chimique.

Cinquante grammes de gaïacol pur cristallisé ont été dissous dans 4 à 5 litres d'eau distillée tiède; on a ajouté 5 grammes du ferment de l'arbre à laque et fait passer un courant d'air. Après quatre jours, l'oxydation était pratiquement terminée.

Le précipité a été recueilli, lavé à fond à l'eau distillée et séché dans le vide. Il pesait 42 grammes.

C'est une poudre formée de cristaux excessivement fins (aiguilles diversement groupées ou globulites, suivant les circonstances de l'oxydation) de couleur rouge pourpre foncé, avec un léger reflet vert métallique. Elle est insoluble dans l'eau,

1. *C. R. Ac. de Sc.*, t. CXXIII, p. 315-317 (1896).

faiblement soluble dans l'éther, un peu plus dans l'alcool, davantage encore dans le benzène. Ses meilleurs dissolvants sont le chloroforme et l'acide acétique. Toutes ces solutions ont la même couleur rouge acajou. Si on ajoute de l'eau à la solution acétique concentrée, la substance dissoute se précipite en flocons denses, violet pourpre, qui, une fois séchés, fondent au bloc Maquenne entre + 135 et 140 degrés.

D'après sa composition et ses propriétés, le produit qui résulte de l'action de la laccase sur le gaïacol est formé par l'union de quatre molécules de gaïacol ayant perdu chacune deux atomes d'hydrogène :

$$4\ C^6H^4.OH.OCH^3 + O^2 = (C^6H^3.O.OCH^3)^4 + 2H^2O$$

C'est une tétragaïacoquinone, dont la constitution est représentée par la formule suivante :

$$\begin{array}{l}
C^6H^3 < \begin{array}{l} O- \\ O.CH^3 \end{array} \\
\quad | \\
C^6H^3 < \begin{array}{l} O.CH^3 \\ O \end{array} \\
\qquad\qquad | \\
C^6H^3 < \begin{array}{l} O \\ O.CH^3 \end{array} \\
\quad | \\
C^6H^3 < \begin{array}{l} O.CH^3 \\ O- \end{array}
\end{array}$$

La tétragaïacoquinone se dissout dans la potasse et la soude diluées en donnant des solutions rouge brun, virant bientôt au vert intense, puis, lentement, au jaune sale. Avec l'ammoniaque, la dissolution est moins facile et la coloration primitive persiste.

Traitée par la poudre de zinc, en solution acétique, elle est réduite, dès la température ordinaire, avec une extrême facilité. La solution se décolore presque complètement et, si on filtre et qu'on reçoive le liquide dans l'eau, il se précipite des flocons blancs de tétragaïacohydroquinone :

$$\begin{array}{l}
C^6H^3 < \begin{array}{l} OH \\ O.CH^3 \end{array} \\
\quad | \\
C^6H^3 < \begin{array}{l} O.CH^3 \\ O \end{array} \\
\qquad\qquad | \\
C^6H^3 < \begin{array}{l} O \\ O.CH^3 \end{array} \\
\quad | \\
C^6H^3 < \begin{array}{l} O.CH^3 \\ OH \end{array}
\end{array}$$

dont le point de fusion est compris entre + 115 et + 120 degrés.

La tétragaïacohydroquinone se colore peu à peu en rose au contact de l'air, par retour au corps précédent. Cette

réoxydation devient extrêmement rapide dans les solutions alcalines.

Les formules ci-dessus ont été établies par l'analyse élémentaire et la détermination du point de congélation des solutions acétiques.

Les analyses ont donné les chiffres suivants :

		Calculé.	Trouvé.	
Tétragaïacoquinone $C^{26}H^{24}O^{8}$	C......	68,85 0/0	68,70 0/0	68,66 0/0
	H.....	4,91	5,16	5,19
Tétragaïacohydroquinone $C^{28}H^{26}O^{8}$	C......	68,57	68,48	68,64
	H.....	5,36	5,49	5,40

Quant aux déterminations cryoscopiques, on les a faites par comparaison, en se servant de composés voisins : le gaïacol et l'hydroquinone. L'acide acétique pur s'hydrate à l'air avec une grande facilité et les chiffres calculés avec la constante 39 sont à cause de cela toujours un peu forts. Ici, comme il ressort des résultats fournis par le gaïacol et l'hydroquinone, l'excès a été d'environ 10 0/0.

	Formules.	P. M. calculé.	P. M. trouvé
Gaïacol..........................	$C^{7}H^{8}O^{2}$	124	128
Hydroquinone...................	$C^{6}H^{6}O^{2}$	110	119
Tétragaïacoquinone	$C^{28}H^{24}O^{8}$	488	527
Tétragaïacohydroquinone.......	$C^{28}H^{26}O^{8}$	490	542

Pour mettre en évidence l'existence de deux fonctions phénoliques dans la tétragaïacohydroquinone, cinq grammes de cette substance ont été dissous dans 10 fois leur poids d'anhydride acétique, et après addition d'un petit fragment de chlorure de zinc fondu, on a chauffé légèrement. La réaction, d'abord très vive, s'est calmée peu à peu. On a porté quelques minutes à l'ébullition tranquille, puis, après refroidissement, le liquide a été jeté dans un excès d'eau. Le précipité, résineux au début, est devenu dur après quelque temps. On l'a dissous à chaud dans 50 c. c. d'alcool à 95/100. En refroidissant, le dérivé acétique s'est déposé en grains sphériques, de couleur jaune, fondant à + 155-160°. On en a recueilli ainsi 2gr,75. L'analyse montre que c'est un dérivé diacétylé :

		Calculé	Trouvé.
$C^{28}H^{24}O^{8}(C^{2}H^{3}O)^{2}$	C...............	66,89	66,74
	H...............	5,22	5,19

L'existence des deux oxhydriles phénoliques a d'ailleurs été confirmée par l'action de l'iodure de méthyle.

On a dissous 5 grammes de tétragaïacohydroquinone dans 20 c. c. d'alcool absolu, ajouté 0gr,5 de sodium préalablement dissous dans 10 à 15 c. c. du même alcool, et chauffé le tout, en tube scellé, à + 100 degrés, avec 5 grammes d'iodure de méthyle. Après 2 h. 1/2, en agitant de temps en temps, la réaction paraissait terminée.

Le contenu du tube a été évaporé au bain-marie pour chasser l'excès d'iodure de méthyle, puis l'extrait sirupeux a été dilué dans un peu d'alcool et traité par l'eau ammoniacale afin de dissoudre l'iodure de sodium et les traces de la substance primitive qui auraient pu échapper à la méthylation.

Le résidu solide, pulvérulent, pesait après dessiccation 5gr,25, soit presque exactement le chiffre théorique : 5gr,28. On l'a purifié en le redissolvant à chaud dans l'alcool à 95/100, filtrant la solution concentrée et précipitant par l'eau froide. Le produit ainsi obtenu a la couleur rosée du sulfure de manganèse. Il fond facilement vers + 80°, en un liquide limpide prenant l'aspect d'une résine par refroidissement. Chauffé à nouveau avec l'iodure de méthyle et l'alcoolate de sodium, il ne subit aucune transformation; on le récupère sans changement de poids. L'analyse élémentaire montre que c'est bien de la diméthyltétragaïacohydroquinone :

		Calculé.	Trouvé.
$C^{28}H^{24}O^{8}(CH^{3})^{2}$	C................	69,49 °/₀	69,30
	H...............	5,79	5,83

D'après ces expériences et celles que j'ai publiées antérieurement, la laccase est donc susceptible de provoquer soit uniquement l'oxydation, soit à la fois l'oxydation et la condensation des corps sur lesquels elle exerce son activité. Le second cas s'est présenté aujourd'hui avec un corps dont la molécule renferme un seul oxydrile phénolique et la condensation a eu pour résultat de fournir, précisément comme dans le cas plus simple l'hydroquinone, un dérivé à fonction quinonique.

On verra plus tard l'intérêt qui s'attache à cette remarque quand il s'agira d'interpréter le processus des actions oxydantes de l'organisme.

ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

(*Suite*. Voir t. XVII, p. 857.)

Par M. E. Duclaux

XI

TERRAINS CALCAIRES

Nous avons maintenant à faire, pour la partie non volcanique du Cantal, l'équivalent de ce que nous avons fait pour le volcan qui en occupe le centre : chercher en chaque point quel est le régime d'eaux, où sont les ressources disponibles, et dans quelle direction il faut aller pour en tirer le meilleur parti.

Nous avons vu les sources que le volcan alimente lorsqu'il est seul, et aussi les gouttières qu'il a creusées dans les couches calcaires qu'il a enfouies et masquées aux yeux, et dans lesquelles les eaux circulent longuement avant de reparaître. J'ai suffisamment insisté sur l'importance de ce niveau d'eaux et sur la puissance de ses ressources. Toutes les belles sources du Cantal lui appartiennent.

Ce qui nous intéresse maintenant, c'est la partie extérieure de ce plateau calcaire, celle qui n'a pas été ensevelie sous la lave. Elle n'est représentée, aujourd'hui, que par quelques larges lambeaux de calcaire miocène et éocène, aux environs d'Aurillac, et par quelques saillies, comme celle d'une falaise, qu'on trouve suspendues à un niveau voisin de 700 mètres sur les flancs solides du volcan, partout où ce niveau est à découvert, sur les bords ou au fond des vallées qui s'y creusent.

La carte ci-dessous donne bien une idée du caractère découpé de ces calcaires et du groupe qu'ils forment dans leur ensemble (fig. 1) [1].

1. Cette carte a été dessinée avec les documents les plus récents : la carte de M. Michel Lévy (Paris, Baudry et Cie) et celle de M. Boule. Naturellement, je les ai simplifiées en n'y mettant que ce dont j'avais besoin : le plateau volcanique (en grisé), les couches calcaires (en hachures), et le terrain primitif (resté en blanc). J'ai aussi supprimé les terrains dits quaternaires. Quand il s'est formé un éboulis au pied et tout le long d'une falaise, j'ai compté qu'il était fait des mêmes matériaux que la falaise, et qu'il devait compter comme falaise pour nos études.

Le mot de falaise vient naturellement sous la plume, car tous ces saillants du sol profond sont exposés à l'action destructive des agents atmosphériques, et subissent une dégradation continue. Les couches volcaniques qui ont protégé ce qu'elles ont recouvert des anciens dépôts, marins ou lacustres, ont hâté la destruction de ce qu'elles en avaient laissé à l'air.

Une masse conique de 1,200 à 1,500 mètres d'épaisseur, qui s'implante sur une partie d'un fond plat de lac, y apporte deux



Fig. 1.

actions nouvelles : des pentes d'abord, et ensuite une augmentation de pluie, qui, grâce aux pentes, exagère son action. Le résultat est que, si ce qui est recouvert est mieux protégé, ce qui est resté exposé à l'air se détruit plus irrégulièrement et plus vite.

Aux environs d'Aurillac, nous trouvons, dans les trois vallées de la Cère, de la Jordanne et de l'Authre, l'ancien plateau calcaire à son niveau de 700 mètres, là où il a été recouvert par le

volcan, et aussi au fond de la vallée, dont le creusement l'a amené à 600 mètres, en moyenne.

Plus loin, dans la plaine commune que se sont faite ces trois rivières, le terrain calcaire se trouve traversé complètement par l'érosion et, là où il est le plus creusé, apparaît le terrain cristallin primaire.

Plus loin encore, on ne trouve plus que les îlots calcaires les mieux conservés, coiffés encore d'un chapeau volcanique; d'autres nus, et plus ou moins réduits. Tout disparaît ensuite, et la rivière doit se frayer sa voie dans les mica-schistes.

Cette destruction sur place du bord Ouest de l'ancien bassin calcaire, dont le bord Est, le seul que nous ayons étudié, est invisible parce qu'il est enseveli sous la lave, fait qu'il est difficile de se faire une idée de son étendue.

Pour le bord Sud de l'ancienne mer calcaire, on est un peu mieux renseigné : la rive gauche de la Cère est dominée, encore aujourd'hui, par un massif de gneiss et de mica-schiste qui dépasse constamment (de 100 mètres aux environs de la Roumiguière) l'ancien niveau calcaire de 700 mètres, et qui, n'ayant pas bougé, nous sert aujourd'hui de terme de comparaison.

Les eaux n'ayant jamais été profondes, nous avons là la rive méridionale de l'ancienne mer.

Plus au Nord, le haut plateau entre la Cère et la Maronne est resté aussi en dehors de l'eau, et si l'on veut chercher, sur le piton central du volcan, les couches contemporaines de celles qu'on trouve encore éparpillées en larges débris à Saint-Santin, à Arnac, à Pleaux, il faut chercher à un niveau supérieur à celui auquel on trouve aujourd'hui, sur ces divers points, la dernière des assises calcaires.

Plus au Nord, on retrouve le calcaire à chaque ouverture de vallée, celle de l'Auze, du Mars, partout où l'érosion a été assez profonde.

Je ne suis pas allé plus loin, et je ne me risque pas à rattacher à ces terrains la large plaque calcaire des environs de Bort, que je n'ai pas étudiée. Nous sommes d'ailleurs ici plus sur le domaine d'action du volcan du Puy-de-Dôme que sur celui du volcan du Cantal. C'est une étude nouvelle à faire, à laquelle se joindra, probablement, celle du calcaire de la Limagne et de la Haute-Loire que je n'ai pas abordé.

EAUX DU TERRAIN CALCAIRE

Avec les allures que nous venons de reconnaître aux terrains calcaires du Cantal, il est facile de se rendre compte de la façon dont s'y comportent les eaux qui y tombent.

Celles qui y arrivent par la portion ensevelie sous la lave sont très réduites : c'est ce qui peut passer de pluie à travers une toiture à grands éléments, qui n'ont pas besoin d'être très bien jointoyés pour donner une couverture presque imperméable.

Justement, à la partie supérieure de ces couches miocènes, on trouve des calcaires compacts qui alimentent des fours à chaux, et des lits de marne grasse.

C'est là le toit de 700 mètres que nous avons étudié, et dont les gargouilles correspondent aux grandes sources placées à ce niveau dans le terrain volcanique. Quant à la portion de ces terrains qui reçoit encore directement de la pluie sur sa surface plus ou moins dénudée, ses couches sont horizontales, et la dénudation sur les pentes créées par le volcan les a découpées en biais sur toute leur épaisseur; leur ensemble repose d'ailleurs sur un terrain absorbant.

Nous ne trouvons donc là aucune indication pour l'existence de couches aqueuses qu'on pourrait exploiter par des puits artésiens. Ces puits ne sont que l'utilisation sur une région des pluies tombées sur d'autres régions plus ou moins éloignées, et ils exigent, des unes aux autres, des moyens naturels de transport souterrain qui manquent ici.

Nous ne pouvons nous attendre à trouver autre chose qu'une courte circulation superficielle le long des lignes de pente, sur les flancs des vallées. C'est là la région des petites sources superficielles à température variable, et des puits. Ce qui était l'exception en pays volcanique devient ici la règle.

L'agriculture traduit cette situation par un mélange de cultures de prairies et de céréales : des prairies là où il y a de l'eau, des céréales là où elle manque. Quant aux eaux de boisson, tant que les maisons sont un peu disséminées, il est facile d'en trouver pour les hommes et les animaux. Mais déjà, pour beaucoup de communes, il y a là un problème plus ou moins heureusement résolu.

Pour donner une idée de la façon dont il se présente, je n'ai

qu'à faire l'histoire du chef-lieu, Aurillac, placé sur un large lambeau de terrain calcaire.

Cette ville est assise sur la Jordanne, de préférence sur la rive droite, le versant le plus riche en eau. Elle occupe le long de la rivière, un terrain en pente dont la déclivité est d'à peu près 50 mètres pour 1 kilomètre en long et en large.

Sur cette surface, on a découvert et on utilise depuis bien longtemps une vingtaine de sources : on a creusé à peu près autant de puits. Les sources, peut-être bonnes à l'origine, venaient sourdre à flanc de coteau aux affleurements des couches de marne. Elles sont devenues impures et dangereuses à mesure que le coteau se peuplait. Quant aux puits, ils ont pris, avec le croît de la population, l'aspect de petits égouts.

Voici la composition de ces eaux en 1895-1900. Les analyses ont été faites de la même façon que dans tout ce mémoire. J'insiste surtout sur la valeur des chiffres relatifs au sel marin, dont il n'y a que très peu lorsque les sources de contamination sont rares. L'ordre est à peu près celui des altitudes décroissantes. La côte de la ville est de 622 mètres.

EAUX D'AURILLAC

Nos d'ordre.	Origine.	Dates.	Tempre.	Résidu.	Chaux.	Sel marin.
—	—	—	—	—	—	—
236	Rue de l'Égalité, Vigier	17 IV 97	10,0	390	123	32
237	—	6 VIII 97	12,2	400	122	22
238	—	31 VIII 97	13,2	406	136	27
239	— Auradour	6 VIII 98	9,6	422	150	32
240	Aurinques, Coudert	17 IV 97	8,8	311	119	11
241	—	6 VIII 97	15,0	316	111	15
242	—	22 VIII 98	16,0	304	144	11
243	— Fau	17 IV 97	8,2	653	175	16
244	Raulhac, Viallard	10 VII 96	»	431	203	32
245	—	22 VIII 98	16,0	428	123	16
246	Raulhac, Trenty	17 IV 97	8,2	582	129	37
247	—	22 VIII 98	14,6	422	192	27
248	Pompe de l'Aumône	17 IV 97	8,2	376	88	46
249	—	6 VIII 97	12,6	226	60	20
250	—	22 VIII 98	15,6	325	75	40
251	Puits Leymarie	17 IV 97	7,8	523	98	86
252	Puits Besse	17 IV 97	8,2	159	48	18
253	Font du Pradet	17 IV 97	7,8	211	63	17

254	Font du Pradet	6 VIII 97	13,4	131	40	8
255	—	22 VIII 98	14,4	124	32	11
159	Pont Rouge	17 IV 97	8,4	293	134	4
160	—	6 VIII 97	»	312	122	6
161	—	22 VIII 98	16,4	312	98	3
162	Enclos Tourdes	22 VIII 98	»	312	175	2

Observations. — 236 à 238, sources au bord de la route, très variables de l'hiver à l'été. — 239, pompe. — 240 à 243, sources des deux auberges du faubourg ; la dernière est un peu, en été, une eau d'égout. — 244 à 247, anciennes sources de l'enclos Raulhac. — 248 à 250, la plus ancienne pompe publique de la ville, adossée à l'église, sur l'emplacement de l'ancien cimetière. — 251, 252, anciens puits abandonnés. — 253 à 255, fontaine très ancienne, autrefois hors la ville, dite du Pradet ou du Pont d'Alliès. — 159 à 162, sources sur la rive gauche de la Jordanne ; elles sortent d'un coteau inhabité et font suite à celles que nous avons étudiées parmi les eaux du bassin de la Jordanne.

La comparaison de ces dernières eaux, les plus basses, avec les premières est instructive. Ce sont partout des eaux de surface qui descendent le long du coteau calcaire, jusqu'à ce qu'elles arrivent au niveau de la rivière.

Dans la zone du faubourg, elles servent surtout à l'arrosage des jardins et y rencontrent d'abord du fumier; plus bas, c'est du détritus humain et des matériaux de fosses d'aisance.

Dans une ville qui, à ce moment, n'avait pas encore d'égouts, il y a partout des nitrates. Mais ce qui avertit le mieux de leur impurification, ce sont les doses de sel marin, qui s'élèvent jusqu'à 40 milligrammes par litre à la pompe publique de l'Aumône, alors qu'elle ne devrait pas dépasser 2 ou 3. En pays calcaire, comme en terrain volcanique, là où il n'y a pas d'hommes et d'animaux, il n'y a pas de sel. Cette fontaine est faite pour en être chargée; elle en contiendrait davantage si elle ne se trouvait pas sur les bords souterrain d'un canal d'arrosage qui a été la première tentative faite par nos aïeux pour se procurer de bonne eau. Il ne remplit plus évidemment son rôle ; c'est un égoût, et la pompe ne mérite plus les fidèles qu'elle a conservés.

Ces sources ou ces puits pollués sont fréquents en ville. J'ai pu en repérer environ une quarantaine et je ne les connais pas tous, surtout dans les faubourgs. On dit qu'on n'y boit pas : on

boit toujours, peu ou prou, l'eau qu'on a dans la maison, surtout quand elle est fraîche, comme l'est d'ordinaire l'eau de puits.

En tous cas, lorsqu'une épidémie de fièvre typhoïde éclate sur une ville bien pourvue d'eau à tous les niveaux, comme l'est Aurillac, personne n'a le droit de suspecter, dès l'abord, les eaux officielles, comme on le fait toujours, parce qu'elles ont toujours quelqu'un derrière elles, ne fût-ce que le garde-champêtre. Il faut d'abord s'assurer que les eaux de puits n'y sont pour rien, et c'est à quoi personne ne songe.

A Aurillac, les eaux les plus réputées, celles de la fontaine de l'Aumône ou celles du Pont d'Alliès, sont 10 et 20 fois plus redoutables, pour ceux qui les consomment, que les eaux municipales, si souvent accusées, et qui peuvent passer pour bonnes, pendant que celles des sources et des puits sont très mauvaises.

Ce serait pourtant aussi une faute que de considérer les eaux de la ville comme à l'abri de tout reproche. Il y a 2 canalisations : l'une, qui date d'à peu près un siècle, amène en ville les eaux du Maurou, réunion, en un point, de divers filets d'eaux sur une colline calcaire à 2 kilomètres de la ville : ces filets sont mal protégés contre des infiltrations. Ils desservent les 5 fontaines jaillissantes.

Au même niveau, vient déboucher en ville une seconde canalisation, empruntée à la rivière, à Bracqueville, à 3 kilomètres en amont d'Aurillac. Cette eau alimente les bornes-fontaines, les bouches d'arrosage et d'incendie, les établissements publics et les concessions privées. Elle n'a pas d'autre pureté que celle d'une rivière quelconque qui, pendant l'été, est parfois presque à sec. Elle est pourtant la plus largement distribuée.

Voici une analyse de ces diverses eaux prélevées, à diverses époques, à leur entrée dans le château d'eau de la ville, aux bornes-fontaines ou chez les particuliers.

153	S. du Maurou	17 IV 95	8,2	131	43	3
154	—	10 IX 96	12,2	160	41	3
258	Jordanne	17 IV 95	7,4	64	12	2
259	—	30 III 96	6,2	43	7	3
260	Fontaine jaillissante	27 VIII 95	»	124	32	3
261	—	30 III 96	7,3	117	43	3
262	—	22 VIII 98	15,6	146	48	5
263	Borne-fontaine	22 VIII 98	18,0	99	25	3
264	Lycée. Réservoirs	—	»	95	25	3

265	— Filtre	—	23,6	94	26	4
266	— Réfrigérant	—	19,6	103	25	10
267	Encl. Rengade	17 IV 97	»	57	10	3

On voit que les deux eaux distribuées à Aurillac diffèrent notablement (ce qu'avaient, du reste, très bien vu ceux qui ont fait leur étude) : l'une est calcaire : c'est l'eau du Maurou, qui a la composition de toutes les eaux à ce niveau ; celles de la Jordanne ont la composition des rivières qui ont coulé seulement sur le terrain volcanique, pauvre en chaux comme en sel marin.

On voit aussi qu'il ne reste plus, dans la pratique, de distinction entre les deux canalisations ni entre les deux eaux.

Les fontaines jaillissantes débitent l'eau du Maurou.

Les bornes-fontaines débitent des mélanges.

Les arrangements hygiéniques pris au lycée ont le sort commun de tous les arrangements pareils quand la foi est officielle, c'est-à-dire n'ouvre pas volontiers un œil. D'où pouvaient provenir ces 10 milligrammes de sel par litre du n° 266, dans un réservoir placé dans un sous-sol et à coup sûr rarement nettoyé ? Je m'en suis bien informé, mais je n'ai pas eu de réponse.

A la caserne, les circonstances étaient différentes. Comme je n'avais que le mandat que je m'étais donné, je me suis abstenu.

En résumé, Aurillac s'abreuve avec trois sources d'eau : une très mauvaise, qu'il faut soupçonner tout d'abord : c'est celle des sources et des puits à l'intérieur de la ville ; une médiocre, c'est celle de la rivière, qui peut s'empoisonner en masse et promener dans toute la ville les germes d'une épidémie, à raison de ce qu'elle va partout ; une troisième, celle des sources du Maurou, qui n'est pas parfaite comme eau de source, mais qui est la meilleure de toutes les trois, et la moins bien utilisée.

Il est clair que cette situation ne peut pas durer. C'est pour y mettre un terme qu'on a mis à l'étude ce projet dont j'ai parlé. Si on consulte à son sujet les données de l'hydrographie de la région, elles nous disent ceci : le mieux est de recourir aux eaux de cet important niveau de 700 mètres, à son affleurement le plus voisin d'Aurillac, qui est à peu près à 9 kilomètres[1].

1. Voir : *Ville d'Aurillac. Question des eaux. Rapport de M. l'abbé Moulier.* 1903.

Le gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE MARS 1904 N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Contribution à l'étude de la spirillose des poules

Par le Dr C. LEVADITI.

(Laboratoire de M. Metchnikoff)

Marchoux et Salimbeni[1] ont décrit récemment, dans ces *Annales* une maladie qui sévit chez la poule et qui est provoquée par un spirille particulier. Cette maladie offre plus d'une analogie avec la spirillose des oies, étudiée par Sakharoff[2], Gabritschewsky[3] et Cantacuzène[4]. Elle est caractérisée par sa courte durée, par la crise, ou plutôt par la lyse qui met fin à la pullulation des spirilles dans le sang, et par l'immunité durable qui succède à l'infection, lorsque l'animal guérit. L'étude de cette maladie présente un grand intérêt, étant donné qu'elle permet de préciser la nature intime de certains phénomènes morbides que l'on rencontre dans la pathologie humaine, en particulier dans la fièvre récurrente. Aussi avons-nous été heureux de pouvoir l'entreprendre, grâce à la bienveillance de M. Marchoux, qui a mis à notre disposition le virus apporté de Rio-de-Janeiro, et qui nous a communiqué les résultats de ses recherches antérieures.

Les expériences de Marchoux et Salimbeni ont montré que la transmission de la spirillose des poules s'effectue, dans les conditions ordinaires, grâce à l'intervention d'un hôte intermédiaire, l'*argas*. En piquant les poules infectées, l'argas absorbe le virus et le conserve pendant très longtemps; il le transmet

1. Marchoux et Salimbeni, ces *Annales*, vol. XVII, sept. 1903, p. 569.
2. Sakharoff, ces *Annales*, vol. V, p. 564.
3. Gabritschewsky, *Cbt für Bakt.*, vol. XXIII, nos 9-18; vol. XXVI, nos 10, 16 et 17; vol. XXVII, no 2.
4. Cantacuzène, ces *Annales*, 1899.

facilement à une poule neuve, laquelle montre les premiers signes de l'infection après une période d'incubation variable[1]. Mais on peut infecter la poule en lui injectant sous la peau une trace de sang contenant des spirilles. Dans ce cas, la maladie commence d'habitude 2 jours après l'inoculation et dure de 4 à 6 jours, moment où apparaît généralement la lyse. Les spirilles disparaissent alors de la circulation générale et l'animal guérit définitivement. Il n'est pas rare pourtant d'observer que certaines poules succombent quelque temps après l'achèvement de cette lyse, en présentant des signes de paralysie, ou bien avant la crise, en pleine période d'infection.

La poule n'est pas le seul organisme susceptible de prendre la spirillose. Les recherches de Marchoux et Salimbeni, ainsi que nos propres constatations, ont montré que l'oie, les jeunes poussins, le pigeon, le domino, le capucin, l'alouette et le calfat (*Padda oryzivora*) peuvent être aisément infectés par l'injection sous-cutanée de quelques gouttes de sang contenant des spirilles. Néanmoins, ces oiseaux ne se comportent pas d'une façon uniforme à l'égard de la septicémie spirillique. Ainsi, les jeunes poussins ne font jamais la crise et meurent farcis de spirilles, 2 à 8 jours après l'inoculation; il en est de même des capucins. Par contre, la crise semble être constante chez le domino, l'alouette et le pigeon. Ajoutons enfin que la pintade se montre réfractaire, ce qui est en désaccord avec les observations de Marchoux et Salimbeni.

Nos recherches se rapportent en particulier à l'étude de l'incubation et de la période d'infection, du mécanisme intime de la lyse, et des propriétés du sérum provenant des poules guéries de spirillose. D'autre part, nous avons entrepris un certain nombre d'expériences en vue d'apporter une contribution à la question si discutée, de l'état de la cytase bactériolytique dans le plasma circulant. Les résultats que ces recherches nous ont permis d'obtenir font le sujet du présent travail.

I

INCUBATION ET PÉRIODE D'INFECTION

Lorsqu'on introduit, dans le tissu sous-cutané d'une poule, une certaine quantité de sang renfermant du virus, on ne constate

1. Cette incubation a été de 5 et 6 jours dans nos expériences.

des spirilles isolés dans la circulation générale, qu'au bout de 2 jours [1]. La méthode de coloration à la vésuvine et au bleu polychrome de Unna, que nous avons décrite récemment[2], permet alors de déceler quelques spirochètes libres parmi les éléments figurés du sang, qui ne montrent encore aucun changement quantitatif ou qualitatif. Il existe donc chez les poules infectées une vraie période d'incubation, que l'on ne peut raccourcir, quelle que soit la quantité de sang infectant introduite sous la peau. Comment expliquer cette période d'incubation?

Inoculons dans le tissu hypodermique ou musculaire d'une poule 0,75 c. c. de sang prélevé sur un animal en pleine période de la maladie, et examinons ce qui se passe au point d'inoculation. Nous verrons que les spirilles, très nombreux et mobiles 35 minutes après l'opération, diminuent de nombre après 2 heures et deviennent sensiblement rares vers la 9e heure. La mobilité de ces spirilles, très accentuée au début de l'expérience, est remarquablement lente au bout de 10 heures. Le lendemain, on ne constate que de rares exemplaires immobiles, qui peuvent parfois faire défaut. En nul instant on ne remarque l'englobement des vibrions par les leucocytes; par contre, la phagocytose des hématies de la poule, ou des noyaux de ces hématies, est quelquefois très prononcée.

Les spirilles disparaissent donc de l'endroit où on les a introduits; il n'y a pas de multiplication locale. Or, si l'on examine microscopiquement le sang de la poule à l'instant même où les microbes ont disparu du tissu sous-cutané, on remarque que ce sang est entièrement dépourvu d'éléments spirilliens. Il résulte donc que les spirilles, puisqu'ils disparaissent du point où on les a injectés et qu'ils sont absents de la circulation, doivent s'être réfugiés quelque part dans l'intimité de l'organisme. L'expérience qui consiste à sacrifier l'animal au bout de 26 heures après l'infection, et à injecter à des poussins du sang défibriné et des émulsions dans de l'eau salée, faites avec le tissu sous-cutané, le foie et la rate, confirme cette prévision. En effet, tandis que ce tissu s'est montré sans effet, l'organe splénique et la pulpe hépatique ont transmis à ces poussins une spirillose mortelle.

1. Chez les petits oiseaux et les jeunes poussins, les spirilles apparaissent dans la circulation générale déjà au bout de 24 heures.
2. Levaditi, *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1903, vol. XL, p. 1505.

Néanmoins, il est à remarquer qu'un des poussins qui a reçu le sang défibriné a présenté également des signes d'infection spirillienne. Ceci prouve que ce sang, quoique stérile au point de vue de l'examen microscopique, n'en renfermait pas moins des spirilles capables d'infecter un animal aussi sensible que le poussin. La rareté excessive de ces spirilles dans la circulation générale explique les résultats négatifs de cet examen microscopique.

Les spirilles disparaissent donc plus ou moins vite du point de l'injection, pour se multiplier dans les organes et la circulation générale. Là, ils se divisent par segmentation transversale et prolifèrent d'une façon démesurée. Cette prolifération s'accompagne bientôt de modifications dans l'aspect histologique du sang, telles que la leucocytose mono et surtout polynucléaire, et la basophilie plus ou moins prononcée des hématies. Parmi ces modifications, la plus remarquable est certainement l'apparition dans le sang, de gros leucocytes mononucléaires non granulés, très probablement d'origine splénique, ainsi que la vacuolisation extrême de ces cellules. Cette vacuolisation, dont la signification nous apparaîtra au cours de ce mémoire, a été déjà vue par Cantacuzène dans la rate des oies atteintes de spirillose; elle est caractérisée par l'apparition dans le protoplasma de ces leucocytes, de grosses vacuoles remplies d'un liquide digestif, et devient d'autant plus prononcée, que l'on se rapproche de la période critique [1].

Un autre fait qui caractérise les derniers jours de l'infection spirillienne, est l'agglutination des spirilles. Cette agglutination, déjà observée par Marchoux et Salimbeni, peut être facilement mise en évidence, si on place une goutte de sang entre lame et lamelle, ou si l'on prépare une goutte suspendue. Sa présence semble plaider, au premier abord, en faveur de la formation d'agglutinines spécifiques au cours de la maladie causée par le spirille brésilien. Il se peut en effet, que dans cette maladie, comme dans la fièvre typhoïde, il s'opère une résorption de corps microbiens, résorption qui aboutit à l'élaboration des principes agglutinatifs. L'étude attentive de ce phénomène montre pourtant que cette interprétation ne saurait être justifiée. Il suffit de suivre un certain temps sous le microscope, à la température de la chambre ou à 38°, les amas de spirilles, pour

1. Rarement on constate dans le sang, des macrophages ayant englobé des hématies nucléées.

se convaincre qu'au bout de quelques minutes, ces spirilles se détachent de leurs congénères, redeviennent libres et se répandent d'une façon uniforme sur toute la préparation. Le temps employé par les vibrions pour reconquérir leur liberté, a varié dans nos expériences, de 4 à 35 minutes; il s'est montré d'autant plus bref, que l'on pratiquait l'examen vers le début de l'infection et que la température se rapprochait de 38°. Ajoutons enfin, que même les amas de spirilles fournis par la poule à une période très rapprochée de la crise finissaient par se défaire au bout de quelques instants.

Il résulte donc qu'il ne peut y avoir là un vrai phénomène agglutinatif. En effet, les agglutinines spécifiques agissent d'une façon d'autant plus intense que le temps de contact est plus durable, et d'autre part, leur action agglomérante croît avec l'élévation de la température. Les spirilles eux-mêmes, lorsqu'ils sont soumis à l'influence d'un sérum provenant d'une poule guérie, sérum qui contient de vraies agglutinines, forment des amas compacts, qui persistent longtemps et qui apparaissent d'une façon plus prompte à 38°. Il est très probable que cette fausse agglutination des spirilles est due au changement brusque que subit, au moment de la prise du sang, le milieu où vivent ces spirilles, et qu'elle ne correspond pas à une agglomération des vibrions dans l'organisme vivant. Ce qui nous le fait penser, c'est que les coupes d'une crête de poule infectée, excisée à un moment où le sang examiné *in vitro*, montrait des spirilles disposés en gros amas, ne renfermaient que des spirochètes isolés. Ce phénomène ne saurait donc nullement être interprété dans le sens d'une formation d'agglutinines au cours de la septicémie spirillique. Ces agglutinines n'apparaissent dans le sérum qu'après la crise, en même temps que d'autres principes actifs, les *immobilisines*.

II

LA CRISE.

La pullulation des spirilles dans le sang des poules infectées augmente jusque vers la fin du 5e ou du 6e jour. On assiste alors, dans l'espace de quelques heures, à la disparition complète de ces spirilles du torrent circulatoire

disparition qui coïncide avec une chute de la température, augmentée pendant l'infection (Marchoux et Salimbeni). En peu de temps, tous les vibrions abandonnent les capillaires périphériques, et si l'on sacrifie à ce moment l'animal, on remarque que les organes sont exempts de spirilles libres.

Quel peut être le mécanisme de cette crise ? Ce mécanisme a fait le sujet de nombreuses recherches, parmi lesquelles on peut citer celles de Metchnikoff[1], Bardach[2], Rudkewitsch[3], Lœwenthal[4], Gabritschewsky[5], Cantacuzène[6], etc. Ces recherches ont abouti à des conclusions qui sont loin d'établir un parfait accord entre les savants qui se sont occupés de cette question. Ainsi, tandis que Metchnikoff et Cantacuzène, s'appuyant sur des observations faites à l'aide du spirille d'Obermeyer et du spirille qui provoque la maladie de Sakharoff, admettent que les phagocytes sont les vrais agents de la crise, pour Gabritschewsky, cette crise est due surtout à l'intervention des propriétés bactéricides des humeurs. Les arguments sur lesquels se basent Metchnikoff et Cantacuzène pour admettre le mécanisme phagocytaire de la crise, sont, entre autres, la persistance de spirilles très mobiles, dans le sang, jusqu'aux derniers moments de la maladie, l'absence de toute transformation granulaire des spirochètes, et la constatation directe de l'englobement des vibrions par les leucocytes (polynucléaires, dans la fièvre récurrente, et macrophages de la rate, dans la spirillose de Sakharoff). De plus, il résulte des expériences de Soudakewitch sur le singe, que l'extirpation de l'organe splénique, qui assure la destruction phagocytaire d'un grand nombre de spirilles circulants, entrave l'apparition de la crise et donne à la maladie un caractère chronique.

Par contre, suivant Gabritschewsky, le rôle prépondérant dans la destruction des spirilles pendant la crise, doit être accordé à l'intervention des bactériolysines du sérum. Cet auteur constate, en premier lieu, que le sérum des individus et des animaux guéris, acquiert bientôt après la crise, la faculté

1. Metchnikoff, *Virchow Arch.*, v. 109, p. 176.
2. Bardach, ces *Annales*, 1899.
3. Rudkewitsch, *Arch. russes de Patholog.*, 1897-1898.
4. Loewenthal, *Deutsch. med. Woch.*, 1897, nº 35.
5. Gabritschewsky, déjà cité.
6. Cantacuzène, déjà cité.
7. Soudakewitch, ces *Annales*, vol. V, p. 545.

d'immobiliser *in vitro* l'agent pathogène de la fièvre récurrente et de la spirillose des oies. Il voit, d'autre part, que les spirilles ont une vitalité variable suivant l'âge de la maladie, en ce sens que les vibrions retirés à une époque rapprochée de la période critique, perdent plus rapidement leurs mouvements que ceux que l'on prélève vers le début de l'infection. Enfin, Gabritschewsky affirme avoir observé la transformation granulaire des spirilles précédée par l'apparition d'un état moniliforme, s'opérer soit *in anima vili*, soit dans le tube à essai.

Le mécanisme de la crise est donc, à l'heure actuelle, un sujet de discussion, et de nouvelles recherches sont nécessaires pour apporter une solution définitive de ce problème. Voyons si les observations fournies par l'étude de la spirillose des poules permettent de préciser d'une façon satisfaisante la nature intime du processus critique.

Si l'on admet la destruction surtout humorale des spirilles au cours de la lyse, et si l'on tient compte des données nouvellement recueillies dans le domaine de l'immunité, on peut concevoir comme il suit la disparition rapide de ces spirilles du torrent circulatoire et des organes Au cours de l'infection, un certain nombre de vibrions ou leurs produits, sont résorbés quelque part dans l'organisme, et provoquent, à la façon des principes immunogènes (*antigènes* de Deutsch), une formation plus ou moins prononcée de sensibilisatrice bactériolytique. La quantité de cette sensibilisatrice augmente au fur et à mesure que la maladie progresse, pour atteindre au moment même de la crise, un summum. A ce moment il s'est formé, chez l'animal infecté, assez de sensibilisatrice spirillolytique pour que la destruction intégrale des spirilles soit possible, naturellement à la condition que cette sensibilisatrice ait à sa disposition une quantité suffisante de cytase. Il s'ensuit alors forcément la bactériolyse *in vivo*, phénomène, qui dans l'hypothèse, est la cause principale de la crise.

Rappelons que cette manière de voir a été soutenue par Sachs [1], au sujet de la résorption des hématies d'espèce étrangère, introduites dans la circulation générale du lapin. Cet auteur constate que les érythrocytes de bœuf, injectés dans les veines du lapin, persistent assez longtemps dans le

1. H. Sachs, *Arch. f. Anat. u. Physiolog.*, 1903, p. 494.

sang périphérique, pour disparaître brusquement, à un moment donné, de cette circulation. Il voit, d'autre part, que cette disparition des hématies de bœuf coïncide avec l'apparition de l'ambocepteur hémolytique dans le sérum et avec l'appauvrissement de ce sérum en cytase.

Quelle que soit la simplicité de cette hypothèse, elle ne saura être acceptée tant que l'on ne réussira pas à démontrer, d'une façon rigoureuse, la transformation granulaire et la dissolution extracellulaire des spirilles pendant la crise. Déjà, pour ce qui concerne la question des érythrocytes, nous avons montré avant Sachs [1] que les hématies de pigeon introduites dans les veines du cobaye se détruisent à l'intérieur des macrophages de la rate, et ne subissent nullement l'hémolyse en dehors des cellules. Pour la spirillose des poules également, nos constatations sont loin de venir à l'appui de la théorie suivant laquelle la destruction critique des spirilles serait surtout humorale.

Examinons ce qui se passe chez une poule depuis les quelques heures qui précèdent la crise, jusqu'à la complète disparition des spirilles de la circulation générale et des organes. Nous verrons que, d'une façon constante, les microorganismes conservent jusqu'à la fin de l'expérience leur entière mobilité, et que, de plus, ils continuent à se diviser comme d'habitude. D'autre part, les préparations faites avec le sang critique montrent, quel que soit le procédé de coloration, l'absence de tout signe de transformation granulaire ou moniliforme des spirilles. On peut affirmer, sans crainte d'être contredit, que les derniers vibrions qui persistent dans les capillaires périphériques, à la fin de la crise, conservent intactes leur mobilité et leurs propriétés morphologiques et tinctoriales.

De plus, si on a soin de sacrifier les animaux à l'instant même où les spirilles ont disparu de la circulation, et si l'on pratique l'examen des organes (foie, rate, moelle osseuse, poumon) sur des frottis, sur des coupes, ou en goutte suspendue (coloration vitale au rouge neutre ou bleu crésyl), on remarque que ces organes sont exempts de spirilles libres, et qu'ils ne renferment aucune production qui pourrait résulter de la transformation moniliforme ou granulaire de ces spirilles.

Ces constatations sont assez probantes, pour mettre

1. Levaditi, *Congr. intern. de Bruxelles*, sect. Bactér., 1903.

déjà en doute l'existence réelle de la destruction extra-cellulaire des spirilles, par un mécanisme analogue à celui qui préside à la dissolution des vibrions cholériques (phénomène de Pfeiffer). Mais d'autres faits, concernant les propriétés bactéricides du sérum des poules atteintes de spirillose, ou guéries de la maladie, s'opposent également à la conception humorale de la crise.

Le sérum des poules qui ont survécu à la septicémie spirillique, prélevé quelques jours après la lyse, possède des qualités immobilisantes et agglutinatives très accentuées.

Expérience A. — Une poule ayant fait sa crise le 5e jour, est saignée 4 jours après la disparition des spirilles. On emploie comme témoin, le sérum de poule neuve et l'eau physiologique, et on apprécie le pouvoir immobilisant et agglutinant de ces liquides, vis-à-vis des spirilles contenus dans 1 goutte de sang de poule malade. L'expérience est faite à la température de la chambre. Elle montre que si 2 gouttes de sérum de la poule guérie immobilisent instantanément les spirilles et les agglutinent en gros amas, la même quantité de sérum de poule neuve n'arrête les mouvements de ces spirilles qu'au bout de plusieurs heures. On observe également que la vitalité des vibrions est plus durable dans ce dernier sérum, que dans l'eau physiologique.

La constitution du sérum immobilisant est complexe; elle reproduit la composition mixte de certains sérums antimicrobiens et anticellulaires, en ce sens que le sérum de poule guérie est formé par une cytase thermolabile et par une sensibilisatrice thermostabile. Les recherches de Sawtchenko[1] ont prouvé la réalité de cette constitution complexe du sérum antispirillique, chez les cobayes activement immunisés. Les expériences que nous avons entreprises à ce sujet, en ayant recours à l'épreuve de Bordet, ne font que confirmer cette manière de voir. En effet, si l'on fixe sur les spirilles une certaine quantité de sensibilisatrice provenant d'un sérum inactif de poule guérie, on observe que ces spirilles, plongés dans du sérum de poule neuve, débarrassent ce dernier sérum d'une partie de la cytase hémolytique qu'il contient. Voici une expérience qui a trait à ce sujet :

Expérience B. — Une poule est saignée le 5e jour de la maladie. On recueille les spirilles du sérum et du sang défibriné, au moyen de la force centrifuge, et on les répartit en deux portions égales *a* et *b*. La portion *a* est mise en contact à 38°, pendant 1 h. 1/2, avec 4 c. c. de sérum de poule neuve, préalablement inactivé à 56°. La portion *b* est mise pendant le même temps en présence de 4 c. c. d'un sérum inactif de poule guérie, saignée

1. Sawtchenko, *Arch. russes de Pathol.* 1900, p. 573.

6 jours après la crise. On recueille de nouveau, par centrifugation, les spirilles. et on les introduit dans 80 gouttes de sérum frais de poule neuve. Les liquides sont maintenus pendant 4 heures à 38° et jusqu'au lendemain à la température de la chambre; on débarrasse ces liquides des spirilles au moyen de la force centrifuge, et on apprécie leur richesse en cytase hémolytique, en se servant d'une sensibilisatrice fournie par des lapins auxquels on a injecté des hématies de bœuf.

Cytase.	Sens. hém.	Eau phys.	Sérum témoin.	Sérum *a*.	Sérum *b*.
0,05	0.3	1,65	bcp.	o	o
0,1	»	1,6	compl.	bcp.	o
0,5	»	1,2	compl.	compl.	p. compl.
0,75	»	0,95	compl.	compl.	. compl.

Le sérum antispirillique est donc constitué par une cytase thermolabile et une sensibilisatrice thermostabile. Néanmoins, il est facile de constater qu'un tel sérum, quoique préalablement chauffé pendant une 1/2 heure à 56°, continue à immobiliser, comme le sérum frais, les spirilles renfermés dans une goutte de sang infectant. Cette observation, en apparence en contradiction avec la thermolabilité de la cytase, s'explique facilement, si l'on pense que le sérum chauffé, mis en présence du sang riche en spirilles, est réactivé par l'alexine que les leucocytes de ce sang mettent en liberté, sitôt le mélange fait.

La constitution complexe du sérum des poules guéries nous permet de préciser davantage certains termes de l'hypothèse de la destruction extracellulaire des spirilles. On sait que la cytase existe dans le sérum des animaux neufs, et que la richesse de ce sérum en complément est sensiblement constante (von Dungern, Simnitzky [1]). Il est établi d'autre part (J. Bordet), que l'immunisation ne modifie guère la teneur du sérum en alexine bactériolytique et hémolytique, et qu'elle se borne à déterminer l'apparition des anticorps spécifiques, en particulier de la sensibilisatrice et de l'agglutinine. On peut donc admettre, si l'on veut se placer au point de vue de l'hypothèse précitée, qu'au cours de l'auto-immunisation qui s'opère pendant l'infection

1. SIMNITZKY. *Münch. med. Woch.* 1903, n° 50, p. 2175.

spirillienne, il se forme une certaine quantité de sensibilisatrice, et que la richesse des humeurs en cette sensibilisatrice, s'accentue au fur et à mesure que l'on se rapproche de la crise. Celle-ci apparaît à l'instant même où ces humeurs renferment suffisamment d'ambocepteurs pour que les spirochètes puissent se dissoudre sous l'influence de la cytase bactériolytique, laquelle ne varie guère pendant l'évolution de la maladie.

Si les phénomènes se passaient réellement ainsi, on devrait constater que les spirilles, puisés aux divers moments de l'infection, sont doués *in vitro*, d'une vitalité inégale, en ce sens que les individus cueillis au voisinage de la crise succombent plus rapidement que les microbes retirés de l'organisme au début de la maladie. De plus, on devrait observer que cette vitalité des spirilles est de beaucoup plus courte, lorsqu'on a soin de placer ces microorganismes dans un excès de sérum frais renfermant de la cytase. En effet, si l'on admet que, vers la fin de l'infection, les spirilles sont insuffisamment sensibilisés, pour pouvoir s'immobiliser et se dissoudre dans le plasma supposé riche en alexine, un excès de cette alexine, ajouté *in vitro* à ces spirilles, ne pourra qu'abréger la durée de leur mobilité. On sait, par exemple, depuis les recherches de Morgenroth, que la présence d'une grande quantité de cytase hémolytique provoque la dissolution complète des hématies insuffisamment sensibilisées. Que répond l'expérience à ce propos?

EXPÉRIENCE C. — Une poule, atteinte de spirillose, est saignée le 3e, le 4e et le 5e jour de la maladie. Elle fait la crise à la fin du 5e jour. Deux gouttes de sang, provenant de ces 3 saignées, sont diluées dans 40 gouttes de sérum frais de poule neuve, et dans une quantité égale du même sérum,

HEURES	TEMPÉRATURE DE LA CHAMBRE						38°					
	Sérum actif.			Sérum inactif.			Sérum actif.			Sérum inactif.		
	3e j.	4e j.	5e j.	3e j.	4e j.	5e j.	3e j.	4e j.	5e j.	3e j.	4e j.	4e j.
24 h.	lent.	lent.	act.	lent.	lent.	act.	lent.	act.	nul.	lent.	act.	nul.
48 h.	lent.	act.	lent.	lent.	lent.	lent.	part.	nul.	nul.	part.	nul.	nul.
70 h.	part.	lent.	lent.	part.	lent.	lent.	part.	nul.	nul.	nul.	nul.	nul.
96 h.	—	lent.	—	lent.	—	—	—	—	—	—	—	—

préalablement inactivé à 55°. On apprécie la vitalité des spirilles, maintenus à la température de la chambre et à 38°.

Il résulte de cette expérience que les spirilles sont d'autant moins viables, en dehors de l'organisme, que l'on se rapproche de la fin de la maladie, comme l'avait déjà affirmé Gabritschewsky. Elle montre de plus, que la température du thermostat exerce une influence défavorable sur la vitalité de ces spirilles. Mais, chose remarquable, on constate que cette vitalité est la même, que les spirilles soient mis en présence d'un sérum actif ou d'un sérum préalablement chauffé à 56°. *L'excès de cytase n'influe donc nullement la longévité des vibrions retirés de l'animal infecté.*

Cette dernière observation permet de mettre en doute l'hypothèse de la destruction extracellulaire des spirilles pendant la période critique. En effet, si les mouvements des microbes puisés au voisinage de la crise cessaient rapidement par suite de l'intervention de la sensibilisatrice, on devrait constater une différence entre les microorganismes soumis à l'influence d'un excès de cytase, et ceux qui ne le sont pas. Il faut donc admettre que d'autres causes entrent en jeu pour déterminer cette variabilité dans la longévité des spirochètes, et parmi ces causes, on devrait peut-être invoquer l'âge de ces microorganismes, et la quantité plus ou moins grande d'individus qui se trouvent dans un même volume de liquide.

On peut pourtant objecter que, dans l'organisme vivant, les spirilles sont réellement chargés de sensibilisatrice au voisinage de la crise, mais qu'ils ne se dissolvent pas encore, pour le motif qu'ils n'ont pas à leur disposition une quantité suffisante de cytase. Néanmoins, l'expérience la plus simple qui consiste à introduire dans la circulation générale d'une poule infectée, une grande quantité de sérum de poule neuve, riche en cytase, et d'examiner l'état des spirilles après l'injection, montre que cette objection n'est pas fondée. En effet, même lorsqu'on administre par voie intra-veineuse, à une poule arrivée au 5e jour de la maladie, de 5 à 6 c. c. de ce sérum, on ne remarque aucune immobilisation des spirilles circulants, et nul signe de transformation granulaire.

Tout porte donc à penser que la sensibilisation des spirilles au cours de la septicémie brésilienne et pendant la crise, n'est

rien moins que démontrée. Malgré nos efforts pour la mettre en évidence d'une façon indiscutable, les résultats que nous avons obtenu ont été des plus défavorables. Nous avons pensé, par exemple, que l'appréciation de la teneur du sérum des poules malades en cytase hémolytique, pourrait fournir des faits en faveur de l'hypothèse de la sensibilisation. Mais, là aussi, les constatations faites ont été en désaccord avec les desiderata de cette hypothèse.

Si les spirilles se détruisaient dans l'organisme en se dissolvant, comme se dissout le vibrion cholérique soumis à l'influence d'un immun-sérum spécifique, on devrait observer immédiatement avant la crise, ou pendant cette crise, une diminution marquée du pouvoir réactivant du sérum vis-à-vis de l'ambocepteur hémolytique. On sait, depuis les recherches de Bordet et Gengou [1], que lorsque ce vibrion cholérique fixe la sensibisatrice bactériolytique et se transforme en granules, il absorbe non seulement l'alexine microbicide, mais aussi la cytase hémolysante. En se dissolvant dans la circulation générale ou dans les organes des poules infectées, les spirilles devraient forcément appauvrir le sérum de ces poules, non seulement en complément spirillolytique, mais aussi en cytase hémolytique.

Or, les expériences que nous avons entreprises dans cette direction, nous ont montré que si le sérum des poules malades perd une partie de sa cytase hémolysante, cette perte est très minime et peut faire même défaut[2]. Elle peut s'expliquer facilement, si l'on se rappelle que tout changement dans l'état physiologique d'un organisme, amène des variations marquées dans la teneur du sérum en alexine hémolytique, que ce changement soit une intoxication (phosphore, Ehrlich et Morgenroth), ou une infection (abcès, Métalnikoff).

Il est donc évident que la disparition des spirilles pendant la crise, ne saurait reconnaître l'intervention d'une sensibilisatrice spécifique, considérée comme agent bactériolytique. Pour cela, il faudrait que le sérum des poules guéries de la maladie possédât des propriétés spirillolytiques manifestes; il faudrait surtout que ce sérum, retiré au moment même de la

1. Bordet et Gengou, ces *Annales*, 1902.

2. Ces expériences ont été faites avec une sensibilisatrice fournie par les lapins injectés avec du sang de bœuf. Les variations de la cytase ont oscillé entre 0,05 et 0,1.

crise, montrât des qualités immobilisantes accentuées. Il faudrait en un mot, que ce sérum eût toutes les particularités du sérum fourni par les animaux vaccinés contre le vibrion cholérique, lequel immobilise, agglutine et transforme en granules ce vibrion. Or, l'expérience montre que ni le sérum des poules guéries, ni celui que l'on prélève au cours de l'infection spirillienne, n'exercent, dans le tube à essai, aucune influence lytique sur les spirochètes. Elle prouve également que les immobilisines ne font leur apparition, dans les humeurs, qu'à une période assez reculée de la crise (24 heures et plus, dans nos recherches) [1].

Si la dissolution extra-cellulaire des spirilles est un fait plutôt supposé que réel, et si un troisième mécanisme capable d'expliquer la disparition critique de ces spirilles, n'intervient pas [2] il faut bien supposer que cette disparition est due à l'action phagocytaire des cellules. Cette action phagocytaire, le microscope nous la montre aisément dans les organes hématopoiétiques, particulièrement dans la rate et la moelle osseuse; elle a été déjà maintes fois constatée (Metchnikoff, Cantacuzène, Ivanoff, Tiktin [3]) et n'est pas niée même par Gabritchewsky, le défenseur le plus ardent de la destruction humorale des spirochettes.

Il y a peu à dire sur cette intervention des phagocytes dans la réalisation de la crise, qui ne soit déjà décrit et figuré par les auteurs qui ont étudié de près cette question. Les figures ci-jointes (planche I), montrent que dans la septicémie de Marchoux et Salimbeni, comme dans la spirillose de Sakharoff, ce sont les macrophages de la rate et de la moelle osseuse qui englobent et digèrent dans leurs vacuoles des spirilles ayant conservé l'intégrité de leurs caractères morphologiques. Les coupes de rate de jeunes poussins, d'alouettes et de dominos, quoique assez difficilement colorables, montrent d'une

1. L'immobilisation des spirilles n'est pas toujours un indice de la mort de ces microorganismes. Souvent, les spirochètes dépourvus de mouvements peuvent se remettre en marche et posséder une virulence assez prononcée.

2. On peut penser, par exemple, que les spirilles se transforment au moment de la crise, dans les formes particulières, représentant un stade quelconque, dans le cycle évolutif de ces parasites. Cette hypothèse, qui a pour elle les constatations récentes de Schaudinn, n'a pas pu être vérifiée par les quelques recherches que nous avons entreprises dans cette voie.

3. Tictin, *Cbt. f. allg. Path-und-Pathol. an*, vol. VIII.

façon indubitable ce phénomène de la phagocytose, que l'on peut déceler d'ailleurs sur les frottis teints à la thionine phéniquée. Mais dans ce dernier cas, les cellules étant plus ou moins détruites par la compression, on ne peut établir qu'avec une certaine difficulté les rapports qui existent entre les spirilles et les macrophages de la rate. Néanmoins, ce qui apparaît d'une façon frappante sur ces frottis, ce sont des vacuoles parfois considérables, remplies de spirilles entortillés ou ondulés, mais nullement granuleux. Ces vacuoles font partie de quelque macrophage écrasé ; il n'est pas rare en effet, de constater qu'elles sont incluses dans les débris protoplasmiques qui entourent le noyau modifié de ces macrophages. Ce qui fait penser de plus, que ces vacuoles appartiennent réellement à des mononucléaires partiellement détruits, c'est que les gros lymphocytes du sang, considérés au moment même où l'on examine la rate, renferment un certain nombre de cavités vacuolaires remplies de liquide, fait qui a été déjà remarqué par Cantacuzène.

Un point seulement doit attirer notre attention dans cet ordre de faits. Si l'on sacrifie les animaux à des intervalles plus ou moins rapprochés de la crise, ou en pleine période critique, et si l'on apprécie l'intensité des phénomènes phagocytaires qui s'opèrent dans les organes hématopoïétiques, on voit que la phagocytose, accentuée pendant l'infection, peut être très faible immédiatement avant cette crise. C'est là une observation qui semble venir à l'encontre de la destruction intra-phagocytaire des spirilles, comme cause déterminante de la crise. Néanmoins, un examen attentif montre que chez les poules sacrifiées pendant l'évolution de la crise, il est possible de déceler par le procédé de la coloration vitale au rouge neutre, des macrophages spléniques renfermant, dans leurs vacuoles, des spirilles dont la digestion est déjà avancée. Il est probable que le pouvoir assimilatif des globules blancs s'accroît au cours de l'infection spirillienne, ce qui fait qu'au moment même de la crise, les spirilles sont anéantis aussitôt qu'ils sont englobés par ces globules blancs. Il est possible également que la sensibilisatrice joue un certain rôle dans la réalisation de ce phénomène de destruction rapide des spirilles à l'intérieur des macrophages. La présence dans les humeurs de l'organisme infecté, d'une quantité d'ambocepteur insuffisante pour provoquer la dissolution extra-cellu-

laire des vibrions, peut faciliter l'englobement et la digestion intra-protoplasmique de ces vibrions. On sait, en effet, depuis les constatations de Sawtschenko, que, chez le cobaye, l'ambocepteur spécifique incite les phagocytes à englober les spirilles, et, très probablement, rend plus efficace l'action digestive des diastases leucocytaires.

Quoi qu'il en soit, l'existence de la phagocytose des spirilles au cours de la septicémie brésilienne, contraste trop avec l'absence de preuves en faveur de la destruction extra-cellulaire de ces spirilles, pour qu'on ne soit autorisé à lui attribuer un rôle déterminant dans le mécanisme de la crise. Les observations que nous avons faites sur la septicémie de Marchoux et Salimbeni, sont ainsi d'accord avec les constatations de Metchnikoff et de Cantacuzène concernant la fièvre récurrente et la spirillose des oies, pour accorder aux leucocytes une influence de premier ordre dans la guérison spontanée des animaux.

III

QUELQUES PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES POULES GUÉRIES DE LA SPIRILLOSE

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que le sérum des poules guéries depuis un certain temps de la spirillose acquiert la propriété d'immobiliser avec une extrême rapidité, les spirilles *in vitro*. Il était intéressant d'étudier l'action exercée par ce sérum sur les poules infectées, et voir, par exemple, s'il n'est pas capable de déterminer l'apparition précoce de la crise. Dans ce cas, on aurait le moyen de préciser le mécanisme de cette crise provoquée, et d'établir un rapprochement entre ce mécanisme et celui qui préside à la production de la crise spontanée.

Si l'on injecte dans les veines d'une poule arrivée au 3e ou au 5e jour de la maladie, de 2 à 4 c. c. de sérum de poule guérie[1], préalablement inactivé à 56°, on constate que cette injection est rapidement suivie de troubles très graves, qui souvant se terminent par la mort de l'animal. La poule est prise d'une forte dyspnée, tombe sur le côté, devient somnolente, présente des convulsions et succombe au bout de quelques minutes. Le sérum

1. L'expérience réussit mieux si l'on se sert de sérums de poules guéries depuis plusieurs jours.

de poule guérie est donc toxique pour l'animal atteint de spirillose; il n'exerce aucune action nocive sur les poules neuves, qui peuvent recevoir, sans danger, 5 et 6 c. c. de ce sérum.

Quelle peut être la nature de cette action toxique du sérum de poule guérie? L'examen du sang, pratiqué à divers intervalles, montre que, malgré les propriétés immobilisantes accentuées de ce sérum[1], les spirilles continuent à se mouvoir jusqu'à la mort de l'animal; il permet de voir également que ces spirilles s'agglutinent d'une façon intense, et que les amas formés, à l'encontre de ceux que l'on observe au cours de l'infection, persistent indéfiniment [2].

Mais l'action du sérum ne se borne pas là. Les préparations colorées montrent, en effet, que les leucocytes mono et polynucléaires de la circulation générale, se disposent en agglomérats autour des spirilles agglutinés et subissent une transformation vacuolaire des plus accentuées. En outre, dans un assez grand nombre de cas, ces leucocytes, influencés par le sérum injecté, saisissent des spirilles entiers et des hématies nucléées, ayant conservé leur hémoglobine (fig. 15).

Le sérum de poule guérie exerce donc une action double sur les éléments qui circulent dans le système vasculaire des animaux malades. Il provoque à la fois l'agglutination des spirilles et l'agglomération des globules blancs, suivie de la vacuolisation plus ou moins intense de ces globules. La mort de l'animal s'explique ainsi facilement, si l'on pense que ces amas de spirilles et de leucocytes déterminent des embolies capillaires dans le poumon et le système nerveux, embolies qui peuvent amener des troubles graves de la respiration et de l'innervation. La question est de savoir si le sérum tue en agissant sur les spirochètes, ou sur les globules blancs de l'animal en expérience. Nos recherches montrent que la première interprétation est la plus vraisemblable. En effet, nous avons constaté que, d'une part, le sérum de poule guérie se montre inoffensif pour des animaux qui, exempts de spirilles, ne présentent pas moins une forte leucocytose (spirillose avortée); nous avons vu, d'autre part, qu'il suffit de fixer dans le tube à essai,

1. Les sérums employés immobilisaient instantanément à les spirilles la dose de 1/10e de goutte pour 1 goutte de sang.

2. Surtout les amas des premières prises de sang (immédiatement et 5 minutes après l'injection).

sur les spirilles, l'agglutinine et l'immobilisine contenues dans ce sérum, pour lui enlever la plus grande partie de son pouvoir toxique.

Le sérum des poules guéries détermine donc la mort des animaux infectés, pour le motif qu'il agglutine *in anima vili* les spirochètes circulants et qu'il provoque ainsi des embolies capillaires dans les divers organes. L'influence particulière qu'il exerce sur les leucocytes s'explique par la présence d'une isoleucoagglutinine, dont la formation est très probablement due à la résorption des globules blancs qui s'opère au cours de la septicémie spirillienne. Ajoutons enfin que ce sérum ne possède nul pouvoir isolytique pour les hématies de poule neuve ou malade.

Mais, tous les animaux infectés ne succombent pas après l'inoculation intraveineuse du sérum de poule guérie. Un certain nombre d'entre eux, surtout ceux qui ont reçu des petites doses, survivent, et alors on peut assister à l'apparition précoce de la crise, qui peut avoir lieu le 3e ou le 4e jour de la maladie. Cette crise succède de très près à l'introduction du sérum; elle survient parfois 3 ou 4 heures après l'opération et ne diffère en rien de la crise spontanée. L'examen microscopique du sang et des organes montre en effet, que cette crise précoce s'accompagne également de l'englobement plus ou moins accentué des spirilles par les macrophages; il permet de voir en outre, qu'aucun signe de transformation granulaire n'accompagne la disparition de ces spirilles du sang périphérique.

Il n'y a qu'une seule dissemblance entre ces deux crises : c'est que, dans la crise provoquée, on rencontre plus souvent, dans le sang circulant, des macrophages ayant phagocyté des spirilles entiers ou entortillés, constatation qui est assez rare au cours de la crise spontanée (fig. 7-11).

Il résulte donc que le sérum de poule guérie, introduit dans les veines d'un animal malade, est capable de provoquer parfois l'apparition précoce de la crise, laquelle reconnaît comme la crise spontanée, l'intervention des phagocytes. Il est à penser que dans ce cas, la sensibilisatrice renfermée dans ce sérum, agit, comme l'ont prouvé les recherches de Sawtschenko, à la fois sur les spirilles et sur les leucocytes, pour déterminer la phagocytose rapide de ces spirilles. On s'explique ainsi facile-

ment cette formation de vacuoles digestives dans les globules blancs influencés par ce sérum, en considérant ce phénomène comme une exagération des fonctions digestives de ces leucocytes. Il s'agit, en somme ici, d'un mécanisme analogue à celui qui préside à la genèse de l'anémie et de l'hémoglobinurie chez les animaux qui reçoivent dans la cavité péritonéale, une certaine quantité de sérum hémolytique inactif. Nos expériences ont montré, à ce propos, que la sensibilisatrice contenue dans ce sérum, en agissant sur les hématies de la circulation et sur les macrophages de la rate, détermine une forte érythrophagocytose dans cet organe, et aboutit à l'anémie et à l'hémoglobinurie constatées [1].

IV

L'ÉTAT DE LA CYTASE BACTÉRIOLYTIQUE DANS LE PLASMA

L'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux ou activement immunisés, est une question très discutée à l'heure actuelle. De nombreux auteurs ont essayé de prouver la liberté de cette cytase dans le sang circulant, en s'adressant à l'étude des plasmas artificiellement préparés (Lambotte [2], Falloise [3], Bellei [4]). Ils ont constaté que les plasmas obtenus, soit par la méthode de Freund, soit à l'aide de divers principes anticoagulants, ont un pouvoir bactériolytique et hémolysant égal, sinon supérieur, à celui du sérum du même animal. Leurs conclusions sont venues ainsi à l'encontre des observations antérieures de Gengou, suivant lesquelles le plasma de plusieurs mammifères, préparé à l'aide de tubes enduits de paraffine, serait moins microbicide que le sérum correspondant.

Néanmoins, la valeur démonstrative de ces expériences ne saurait égaler celle des recherches faites dans l'organisme vivant, recherches qui prouvent que les qualités réactivantes du sang circulant vis-à-vis d'une sensibilisatrice vibriolytique ou cytolytique, sont inférieures à celles du sérum, sinon nulles [5]. Comme le remarquent Löwit et Schwarz [6], la présence de la

1. Levaditi, ces *Annales*, 1902.
2. Lambotte, *Cbl. für Bakt.*, vol. XXXIV, n° 1, p. 453.
3. Falloise, *Bull. Acad. roy. de Belgique*, 1903, p. 521.
4. Bellei, *Münch. med. Woch*, 1904, n° 2, p. 55.
5. Levaditi, Ces *Annales*, 1901-1902.
6. Löwit et Schwarz, *Arch. für. Heilkunde*, 1903.

cytase dans les plasmas artificiels ne peut être invoquée en faveur de la liberté de cette cytase, qu'à la condition d'expérimenter avec des plasmas littéralement dépourvus de fibrinferment. Or, les expériences de contrôle entreprises par les auteurs allemands, ont montré que tous ces plasmas artificiels, même celui obtenu d'après la méthode de Delezenne, contiennent des quantités appréciables de plasmase et que, par conséquent, on n'est nullement autorisé à les identifier avec le plasma qui circule dans l'organisme vivant.

Nous avons entrepris un certain nombre de recherches pour préciser si, dans la spirillose, maladie où les microorganismes circulent longtemps dans le système vasculaire, il y a une dissemblance entre les propriétés du sérum et du plasma, considérés au même moment de l'infection. Malheureusement, ces recherches ont été rendues difficiles par le fait que la forte leucocytose qui existe au cours de la spirillose, confère au sang une très grande coagulabilité, et empêche la préparation d'un plasma idéal d'après le procédé de Delezenne. Pourtant, dans bon nombre de cas, il nous a été possible d'obtenir du plasma de poules infectées qui se maintenait liquide pendant plusieurs heures. Dans ces cas, nous n'avons pu remarquer aucune différence entre les propriétés de ce plasma et celles du sérum correspondant, appréciées à l'égard des spirilles de la même poule; il en fut de même du plasma et du sérum des animaux guéris de la maladie.

Un fait, pourtant, a été constant dans ces recherches. C'est que ce plasma, quoique relativement incoagulable, agglutinait les spirilles d'une façon beaucoup plus intense que le sérum, à un moment où, dans la circulation générale de la poule qui fournissait ce plasma et ce sérum, ces spirilles étaient isolés et mobiles. Ce fait est très important, puisqu'il permet de conclure que *le plasma préparé par nous, possédait, en dehors du fibrin-ferment, des propriétés agglutinatives qui n'existaient guère dans les humeurs de l'animal vivant*. Ce plasma ne saurait par conséquent être identifié avec celui qui circule dans le système vasculaire, et l'étude de ses propriétés bactéricides et hémolytiques ne peut nullement être utilisée, pour résoudre définitivement le problème de l'état de la cytase dans le courant circulatoire.

EXPLICATION DE LA PLANCHE I

FIG. 1 à 4. — Coupes de rate de domino. *a*, macrophages avec grosses vacuoles renfermant des spirilles (*s*).

FIG. 5. — Gros mononucléaire du sang périphérique d'une poule infectée. *g*, hématie englobée; *s*, spirilles libres.

FIG. 6. — Macrophage de la rate d'une poule, sacrifiée au 4e jour de l'infection. *v*, vacuole avec spirille.

FIG. 7, 8 et 11. — Macrophages du suc pulmonaire prélevé chez une poule infectée (injection intra-veineuse de 2 c. c. de sérum de poule guérie). *v*, vacuoles avec *s*, spirilles entortillés.

FIG. 9 et 10. — Gros mononucléaires du sang périphérique puisé chez une poule infectée, qui a reçu en injection sous-cutanée 2 c. c. de sérum de poule guérie (crise). *v*, vacuoles avec *s*, spirilles; *g*, hématie partiellement englobée.

FIG. 12. — Coupe de rate d'un poulet mort le 4e jour de la maladie. *m*, macrophages avec *s*, spirilles entortillés. et *s*, spirilles droits.

FIG. 13. — Coupe de rate d'alouette infectée : *m*, macrophages renfermant une masse hyaline (*h*) et des spirilles (*s*) dans une vacuole (*v*).

FIG. 14. — Frottis de rate de poule infectée, *m* macrophages ; *s* spirilles entortillés, renfermés dans des vacuoles, *n* macrophage écrasé.

FIG. 15. — Amas de leucocytes dans le sang du cœur d'une poule ayant reçu, en injection sous-cutanée, 2 c. c. du sérum de poule guérie, *m* macrophage ayant englobé deux hématies *h*; *p* leucocyte polynucléaire renfermant un spirille, *s*, dans une vacuole, *v*.

Le Passage du Virus Rabique à travers les Filtres

Par M. P. REMLINGER [1]

DEUXIÈME MÉMOIRE.

Depuis la publication de notre première note [2], plusieurs travaux ont paru, de nature à modifier l'opinion classique que le *virus rabique ne passe pas à travers les filtres.* Le 28 juin 1903, di Vestea annonce à l'Académie médicale de Pise qu'en filtrant une émulsion de virus rabique à travers la bougie Berkefeld sous une pression de 2 à 6 atmosphères, il a réussi quatre fois sur six à mettre en évidence le passage du virus. La même expérience, répétée avec Chamberland F, lui a donné également des résultats positifs, quoique avec une fréquence moindre.

Un peu plus tard, Schüder [3] trouve un filtre (il n'en donne malheureusement pas la composition) qui arrête le vibrion cholérique, mais laisse passer à tout coup le virus rabique : « Avec le filtrat, dit-il, on arrive à reproduire la rage avec la même régularité que si on inoculait une émulsion du cerveau d'animaux enragés. »

Bertarelli et Volpino [4] réussissent eux aussi à obtenir avec la bougie Berkefeld un filtrat infectant. Moins heureux que di Vestea, ils échouent avec Chamberland F. Comparant la filtration à travers la terre d'infusoires et le papier, ils obtiennent un filtrat actif à travers un papier simple et un filtrat inactif à travers un triple papier.

Celli et de Blasi [5] traitèrent avec du sable fin le cerveau et la moelle d'animaux ayant succombé au virus de rue ou au virus fixe, et ils soumettent le mélange à une pression de trois cents atmosphères au moyen de l'appareil de Büchner. Le liquide qui s'écoule est étendu d'eau, infecté avec des cultures

1. Ces *Annales*, décembre 1903.
2. *Société de Biologie*, 13 juin 1903.
3. Schuder, *Deutsche med. Wochenschrift*, 24 septembre 1903.
4. Bertarelli et Volpino, *Riv. d'Igiene e sanita publica*, 16 novembre 1903.
5. Celli et de Blasi, *Deutsche med. Wochenschrift*, 10 décembre 1903.

virulentes, et filtré au moyen de la trompe à travers des bougies Berkefeld ordinaires. La plupart des chiens et des lapins qui reçoivent sous la dure-mère 1/4 à 1/2 c. c. du filtrat succombent. Les uns meurent de rage paralytique comme le démontrent les passages. Les autres succombent à des accidents rappelant ou non la rage, et qui paraissent devoir être ainsi attribués à l'action de la toxine rabique.

Les faits précédemment annoncés par nous se trouvant ainsi confirmés, nous désirons combler quelques lacunes de notre premier mémoire et essayer de faire faire à cette question de la filtration du virus rabique quelques pas en avant.

I. PASSAGE DU VIRUS A TRAVERS PLUSIEURS BOUGIES BERKEFELD V.

Le virus rabique traversant très facilement la bougie Berkefeld V, il était intéressant de rechercher ce que devenait ce passage lorsqu'on essayait de l'effectuer à travers non plus une seule, mais plusieurs bougies V.

Le 13 décembre 1903, le cerveau d'un lapin ayant succombé au virus fixe est émulsionné finement dans 300 c. c. d'eau, puis on fait traverser à cette émulsion la bougie Berkefeld V. On conserve la quantité de filtrat nécessaire à l'inoculation de 10 lapins. Le reste est passé à travers une 2e bougie V. On conserve encore le liquide nécessaire à 10 trépanations. Le reliquat est filtré à travers une 3e Berkefeld V. et on trépane 10 nouveaux lapins. Les résultats obtenus ont été légèrement paradoxaux. 6 lapins du premier lot, 7 du deuxième et 9 du troisième ont pris la rage.

II. PASSAGE DU VIRUS A TRAVERS LES BOUGIES BERKEFELD N ET W.

L'expérience précédente paraissait démontrer que l'organisme ultra-microscopique de la rage était arrêté dans les bougies, en raison moins de ses dimensions que du colmatage des parois filtrantes par les matières albuminoïdes de l'émulsion, et elle permettait de supposer que, si on parvenait à supprimer ou tout au moins à diminuer ce colmatage, on pourrait faire traverser au virus rabique des bougies plus serrées que Berkefeld V. La dilution de l'émulsion était le moyen le plus simple d'arriver à ce but. Elle a donné des résultats négatifs. Des résul-

tats meilleurs ont été obtenus en usant au couteau une bougie Berkefeld V, en filtrant une première fois au travers l'émulsion rabique, puis en faisant traverser à ce filtrat une Berkefeld N ou W. La réussite de cette expérience n'est pas fatale. Il est bon de choisir des lapins jeunes et d'inoculer à chacun d'eux un 1 c. c. 1/2 de liquide. Dans les deux faits qui suivent, ces conditions ont été réalisées et le passage du virus a pu être démontré :

Expérience I. — Le 5 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c.c. d'eau. L'émulsion est passée à travers une Berkefeld V dont les parois ont été usées au couteau. La filtration s'opère rapidement, beaucoup plus facilement qu'avec une bougie Berkefeld ordinaire. Le liquide obtenu est légèrement louche. Deuxième filtration à travers Berkefeld N. Le liquide passe clair. Il est inoculé à la dose de 1 c. c. 1/2 sous la dure-mère de dix jeunes lapins. Deux animaux ont succombé le 17 et le 18 (12e et 13e jour) à une rage paralytique classique. Passages positifs.

Expérience II. — Le 6 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné de même dans 250 c. c. d'eau. Passage à travers une Berkefeld V usée au couteau. Le filtrat est louche. Passage à travers Berkefeld W. Le liquide est clair. Il est inoculé à la dose de 1 c. c. à 1 c c. 1/2 sous la dure-mère de 10 lapins. Le 17 janvier, le plus petit des dix animaux inoculé (poids 1 kilogr) présente une légère paralysie du train postérieur. Le lendemain, la rage paralytique est classique. Mort le 19 (13e jour); le bulbe sert à faire deux passages. Ces deux animaux sont pris l'un et l'autre le 26 janvier (7e jour). Ils ont succombé l'un le 27 (8e jour), l'autre le 29 (10e jour).

La bougie Berkefeld W est une bougie extrêmement serrée. De ce qu'elle peut livrer passage au virus rabique, il s'ensuit que ce virus est notablement plus petit que nous ne l'avions cru.

III. VIRUS RABIQUE ET BOUGIE CHAMBERLAND F.

Nous avons essayé à l'aide du même procédé de faire traverser au virus la bougie Chamberland F. Nous avons échoué.

Le 28 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. L'émulsion est filtrée à travers une bougie Berkefeld usée au couteau puis, à travers Chamberland F. Le filtrat est inoculé à la dose de 1 c. c. à 1,5 c. c. sous la dure mère de 10 lapins. Aucun de ces animaux n'a contracté la rage.

Il eût été intéressant d'essayer de faire traverser le virus à des bougies F^4, F^5... F^{10} débitant 4, 5... 10 fois plus d'eau que les bougies F. Malheureusement, il nous a été impossible de nous procurer de ces modèles. Nous avons obtenu par contre les mêmes résultats négatifs avec une bougie Chamberland dont

les parois avaient été, avant la stérilisation, usées au papier de verre.

Le 1er février 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. On ajoute 4 cultures en bouillon de choléra des poules, et on filtre à travers une Chamberland F dont les parois ont été très amincies par friction au papier de verre. Inoculation de 8 lapins avec 1 c. c. à 1,5 c. c. du filtrat. Aucun de ces animaux n'a succombé à la rage, non plus du reste qu'au choléra des poules.

IV. MANQUE DE CORRÉLATION ENTRE LE DÉBIT D'UNE BOUGIE ET LE PASSAGE DU VIRUS RABIQUE

En présence de ces résultats négatifs, nous avons comparé le débit de bougies Chamberland qui n'avaient pas laissé passer le virus et le débit de bougies Berkefeld qui s'étaient au contraire laissé traverser par lui. Il s'est trouvé, tous calculs faits, que le débit dé ces dernières était sensiblement moins considérable. Faut-il conclure de là que les bougies de porcelaine présentent au passage du virus rabique une résistance plus forte que les bougies en terre d'infusoires? Cette conclusion ne s'impose nullement, car, toutes choses égales d'ailleurs : poids du cerveau, degré de la dilution, pression, durée de la filtration, etc., il existe entre le débit d'une bougie et le passage du virus rabique un rapport beaucoup moins étroit qu'on ne le supposerait à priori. L'expérience suivante en fait foi :

Avec une amabilité dont nous avons le devoir de la remercier ici, la maison Berkefeld a bien voulu nous fabriquer des bougies ayant toutes les mêmes dimensions, 5 c. de long sur 2,5 c. de large, mais dont le débit variait entre 769 et 288 c. c. (calcul fait pour 1 minute et une pression de trois atmosphères). Ces différentes bougies ont été stérilisées, puis chacune d'elles a servi à filtrer l'émulsion d'un cerveau de lapin dans 250 c. c. d'eau. Le liquide a été injecté à la dose de 1 c. c. sous la dure-mère d'un certain nombre d'animaux. Le tableau suivant fixe les résultats obtenus.

Débit de la bougie.	Nombre de lapins inoculés.	Nombre de lapins qui ont pris la rage.	Pourcentage.
—	—	—	—
769 c. c.	7	7	100 0/0
576 —	8	8	100 0/0
528 —	8	6	75 0/0

480 c. c.	8	5	62 0 0
432 —	7	1	14 0 0
384 —	6	4	66 0 0
336 —	6	0	0
288 —	9	6	66 0 0

Il eût été intéressant de poursuivre cette expérience avec des filtres d'un débit plus faible encore. Mais les dernières bougies employées figurant déjà parmi les bougies N que, d'après nos expériences, le virus rabique ne traverse qu'exceptionnellement, nous avions jugé inutile de faire fabriquer des bougies d'un débit inférieur à 288 c. c. L'expérience précédente ne donne donc pas la limite de la perméabilité des bougies Berkefeld au virus rabique. Elle montre seulement qu'il n'existe pas de rapport étroit entre le débit et la traversée du virus, et elle fait concevoir le passage des organismes ultra-microscopiques à travers les filtres comme une opération singulièrement complexe.

Remarquons ici combien les dénominations: Chamberland B, F; Berkefeld V, N, W (viel dürchlässig, normal, wenig dürchlässig) sont peu précises pour des expériences qui doivent tendre à la rigueur mathématique. Malgré l'absence de corrélation qui vient d'être exposée, il serait, semble-t-il, beaucoup plus scientifique de désigner les bougies par leur débit dans un temps donné et pour une pression déterminée.

V. PASSAGE A TRAVERS LES FILTRES DU VIRUS DE RUE.

Toutes les expériences sur lesquelles était établi dans notre 1er mémoire le passage du virus rabique à travers les filtres avaient été faites avec du virus fixe. Le virus de rue ne se comporte pas différemment. On pouvait supposer à priori qu'avec le virus de rue, le chiffre d'atteintes des lapins serait moins considérable. Il n'en a rien été et il n'a été relevé entre les deux virus aucune différence appréciable.

Le 25 octobre, le bulbe d'un chien mort de rage est émulsionné finement dans 250 c. c. d'eau. L'émulsion est passée à travers Berkefeld V, et le filtrat inoculé à la dose de 1 c. c. à 1,5 c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. 4 animaux sont demeurés indemnes. Les 6 autres ont succombé à la rage du 16e au 20e jour après l'inoculation.

VI. ALLONGEMENT DE LA PÉRIODE D'INCUBATION DANS LA RAGE DUE AU VIRUS FILTRÉ.

Il n'a pas été observé d'exception à cette règle que, chez les lapins inoculés avec du virus filtré, la période d'incubation n'est jamais inférieure à 10 jours. La grande majorité des animaux est prise le 11e ou 12e jour. Il a été noté par contre des incubations beaucoup plus longues : 14, 15 jours; 16 jours dans une observation; 19 jours dans une autre[1]. Ces faits constituant une analogie curieuse entre le virus de la rage et celui de la fièvre jaune, il paraît intéressant de les signaler avec quelque détail :

Exp. — Le 14 janvier 1904, un cerveau de lapin est émulsionné dans 250 c. c. d'eau. Filtration à travers une bougie Berkefeld V très perméable (débitant 769 c. c. d'eau à la minute sous une pression de 3 atmosphères). Inoculation du filtrat à la dose d'un c. c. sous la dure-mère de 7 lapins. 5 d'entre eux ont présenté les premiers symptômes de la rage le 24 janvier (10e jour) et sont morts le 26 (12e jour). Un 6e lapin se porte très bien jusqu'au 30 janvier (16e jour). C'est seulement à cette date qu'il présente un peu de tristesse et d'inappétence. Le 31 janvier, commencement de paralysie du train postérieur. La paralysie est manifeste le 1er février. et l'animal meurt le lendemain (19e jour). Un 7e lapin demeure en excellente santé jusqu'au 2 février (19e jour). A cette date, le train postérieur apparait légèrement parésié. Le lendemain, la paralysie est plus accusée. Le 4 février, état stationnaire. Le 5, la paralysie progresse, mais très lentement. L'animal est couché le 6 au matin. Il meurt le 6 au soir, 5 jours après le début de sa maladie, 23 jours après l'inoculation. Le diagnostic de rage a été confirmé par deux trépanations.

VII. RAGE ATYPIQUE DÉTERMINÉE PAR LE VIRUS FILTRÉ

On remarquera que, dans cette dernière observation, ce n'est pas seulement la période d'incubation, mais encore la maladie elle-même qui s'est trouvée allongée. La durée de la rage paralytique chez le lapin est de 48 heures, rarement de 72. Dans le cas précédent, la maladie n'a pas duré moins de cinq jours. Les faits de ce genre sont rares avec le virus filtré. La maladie a plutôt une tendance à être plus courte qu'avec le virus fixe. La paralysie peut exceptionnellement durer une journée seulement ou même quelques heures. D'autres fois, on est surpris de trouver un matin mort dans sa cage un lapin qui

1. Il va sans dire qu'il est exclusivement question ici des lapins trépanés avec du filtrat de virus fixe.

la veille au soir présentait seulement de l'inappétence, de la stupeur et une parésie douteuse du train postérieur. Or les passages viennent démontrer l'existence de la rage. Ces faits sont tout à fait exceptionnels. Néanmoins, ils sont utiles à connaître en raison des erreurs que leur ignorance pourrait entraîner.

Obs. I. — Un lapin qui a reçu le 12 janvier un c. c de filtrat Berkefeld V présente le 25 (13e jour) de l'inappétence, de la somnolence et une légère parésie du train postérieur. On le trouve mort le 26 au matin, 2 passages. Mort classique des lapins le 5 et le 6 février (10e et 11e jours).

Obs. II. — Un lapin reçoit le 10 janvier un c. c. de filtrat Berkefeld V. Le 22 janvier, alors que la plupart des animaux du même lot sont pris, il est encore très bien portant. Le 23 au matin, commencement de paralysie du train postérieur. Nous le revoyons à 4 heures du soir. Son état est stationnaire. Une demi-heure plus tard, on vient nous dire qu'il est mort. Nous le trouvons le corps raidi, les pattes repliées comme s'il avait succombé au cours d'une crise convulsive. Deux passages sont immédiatement pratiqués. Mort classique le 2 et le 3 février.

Obs. III. — Un lapin reçoit le 12 janvier 1 c. c. de filtrat Berkefeld V. Le 24, il ne mange pas et se laisse prendre dans sa cage sans tenter de s'enfuir, mais on ne constate aucune paralysie. Il est trouvé mort le 23 au matin. 2 passages. Mort le 1er et le 2 février (9e et 10e jours). Deux nouveaux passages. Les résultats sont encore positifs.

La conclusion à tirer de ces faits est qu'au cours des expériences sur la filtration du virus rabique, il est nécessaire de faire des passages avec le bulbe de tous les animaux qui succombent du 10e au 16e jour après l'inoculation. Il arrivera parfois — exceptionnellement il est vrai — que la rage sera démontrée expérimentalement dans des cas où, cliniquement, elle aurait pu à peine être soupçonnée.

VIII. PASSAGE A TRAVERS LES BOUGIES DE LA TOXINE RABIQUE

Nous avons signalé dans notre premier mémoire que parmi les animaux inoculés avec du filtrat Berkefeld V, quelques-uns, assez rares en vérité, succombent dans des délais un peu plus courts que les lapins rabiques et après avoir présenté les mêmes symptômes qu'eux, à cette différence près que la paralysie reste limitée au train postérieur. Encore est-elle incomplète. Cliniquement, étant donnés les faits décrits au paragraphe précédent, cet état est impossible à distinguer de la rage. L'autopsie laisse également dans le doute. Elle révèle le plus souvent, mai non

toujours, un envahissement précoce du sang et des organes par des microbes agoniques. Aucune autre particularité. Les passages seuls peuvent aider au diagnostic. Les lapins inoculés sous la dure-mère avec une émulsion du bulbe meurent de méningite ou plus rarement survivent. Ceux qui ont été inoculés sous la peau ou dans les muscles demeurent indemnes... Voici un nouvel exemple de ce complexus symptomatique.

Le 24 janvier, 8 lapins reçoivent sous la dure-mère un c. c. de filtrat Berkefeld V (bougie débitant 432 c. c. par minute). Le 3 févrler (10e jour) un lapin présente uu commencement de rage paralytique. La rage est classique le 4. Mort le 5. Le 3 février également, un 2e lapin montre de la tristesse, de l'inappétence. Le soir il existe un début de paralysie du train postérieur. Mort le 4 au matin. L'autopsie immédiatement pratiquée ne donne pas la cause de la mort. L'ensemencement du sang du cœur révèle la présence du staphylocoque blanc et du coli-bacille. Deux lapins sont inoculés par trépanation. L'un succombe le surlendemain à une méningite coli-bacillaire. L'autre survit. Il n'a présenté aucun symptôme de rage, non plus que deux jeunes lapins inoculés dans les muscles de la nuque.

Il paraîtra logique d'attribuer à l'action de la toxine rabique des faits de cette nature.

A côté de ces accidents qu'on pourrait, appeler : « spécifiques », car ils présentent les plus grandes analogies avec la rage, la toxine rabique paraît pouvoir en déterminer d'autres un peu plus fréquents, mais de nature plus banale. Parmi les lapins qui ont reçu sous la dure-mère 1 c. c. à 1 c. c. 1/2 de filtrat Berkefeld V, il en est quelques-uns qui maigrissent, se cachectisent et meurent finalement. Les passages sont négatifs. Il est d'autres animaux qu'on est surpris de trouver morts un matin, alors que la veille ils ne paraissaient nullement malades. A l'autopsie, aucune autre particularité qu'un envahissement précoce des organes et spécialement du système nerveux par des microbes d'infection agonique. Ces cas de mort ne se voient pas chez les lapins qui reçoivent sous la dure-mère du filtrat de cerveau sain. D'autre part, on les observe surtout le 8e, le 9e et le 10e jours après l'inoculation. On est ainsi tenté

de les attribuer à l'action de la toxine rabique. Celli et de Blasi qui, au lieu d'émulsionner les cerveaux infectieux, les soumettent à une pression de 300 atmosphères avant de les filtrer, ont observé avec une fréquence beaucoup plus grande ces phénomènes cachectiques et ces morts subites. Dès lors, la toxine rabique ne serait-elle pas en partie intra-cellulaire? Il faut noter aussi la curieuse propriété que paraît posséder cette toxine de favoriser le développement des infections agoniques. Celli et de Blasi ont constaté comme nous la présence fréquente du coli et du protéus dans les organes des animaux qui succombent à des accidents de cette nature.

IX. APPLICATIONS PRATIQUES

Au point de vue scientifique pur, il n'est pas indifférent de savoir que le virus rabique, dont la nature a tant exercé la sagacité des chercheurs, appartient à la classe des organismes ultra-microscopiques et que la rage doit prendre place à côté de la peste bovine, de la fièvre aphteuse, de la fièvre jaune et de la clavelée. Au point de vue pratique, la connaissance de la nature du virus rabique semble être au contraire de médiocre importance. La possibilité de la filtration du virus ne paraît devoir comporter que de rares applications dont les principales sont les suivantes :

1° *Isolement du virus rabique.* — Une fois démontré que la bougie Berkefeld V laissait passer le virus rabique dans des conditions où elle retenait les microbes « visibles » avec lesquels ce virus avait été artificiellement souillé, il était indiqué d'appliquer ce fait à l'isolement du virus rabique dans les circonstances où la souillure est non plus artificielle, mais naturelle. C'est ce qui a été réalisé dans les expériences suivantes [1].

Expérience I. — Un lapin trépané avec du virus fixe meurt le 9 octobre. Son cerveau est enlevé et conservé à la température du laboratoire jusqu'au 10. Il est alors en pleine putréfaction. On émulsionne dans 300 c.c. d'eau et on filtre à travers Berkefeld V. Le filtrat est inoculé à la dose d'un c. c. sous la dure-mère de 10 lapins. Un lapin présente des symptômes méningitiques le 15 octobre et meurt le 16 (les ensemencements du filtrat

1. Les trois premières de ces expériences ont été communiquées à la Société de Biologie à la séance du 21 novembre 1903.

ont montré qu'un micro-organisme petit, mobile, non déterminé, avait traversé la bougie). 7 autres lapins présentent le 24 octobre (11e jour) les premiers symptômes de la rage paralytique et succombent le 25 ou le 26. 2 animaux sont demeurés indemnes.

Expérience II. — Un chien inoculé sous la peau avec du virus fixe meurt le 18 octobre. Le bulbe est extrait le 20. Il commence à se putréfier. Il est laissé à l'étuve à 37o jusqu'au 21. Le 21, émulsion dans 300 c. c. d'eau. Filtration à travers Berkefeld V et inoculation sous la dure-mère de 8 lapins. Les ensemencements pratiqués avec le filtrat montrent que la bougie a laissé passer quelques unités d'un microbe fin et mobile. Néanmoins, aucun lapin ne présente de symptômes morbides les jours qui suivent l'inoculation. Le 31 octobre (10e jour), 4 lapins; le 1er novembre (11e jour), 4 autres lapins commencent à présenter des symptômes de rage. Tous succombent du 2 au 4 novembre. Il a été fait des passages qui ont fourni des résultats positifs classiques.

Expérience III. — Le 19 octobre, la municipalité nous adresse un chien de rue paralytique et par conséquent fort suspect de rage. Il meurt le lendemain. On laisse le cadavre se putréfier pendant 3 jours. Le bulbe est alors extrait. On le conserve à la température de la chambre pendant 24 heures encore. Le 24, émulsion dans 300 c. c. d'eau. Filtration à travers Berkefeld V. Trépanation de 10 lapins avec 1/2 à 1 c. c. du filtrat. Aucun développement en bouillon. 1 lapin meurt accidentellement le 6 novembre. Le 9 novembre (16e jour) début de la rage chez un lapin. Le 10 (17e jour), début chez un autre lapin; le 11 (18e), chez 3 lapins; le 12 (19e) chez 2 lapins; le 13 (20e), chez un lapin. Tous ces animaux succombent après 1 à 3 jours de maladie. 1 seul lapin est demeuré indemne.

Expérience IV. — Le 20 octobre, la municipalité nous adresse un chien trouvé paralysé dans la rue. Il meurt quelques heures après son arrivée. Le cadavre est laissé dans le chenil jusqu'au 23 octobre, date à laquelle on procède à l'ablation du bulbe. Celui-ci est mis à l'étuve à 22o jusqu'au lendemain. Le 24, il est émulsionné dans 200 c. c. d'eau et filtré à travers Berkefeld V. Le filtrat est ensemencé dans 12 tubes de bouillon. 6 sont laissés à la température de la chambre (aucun d'eux ne se trouble). 6 sont mis à l'étuve à 37o, 5 sont demeurés stériles. Dans le 6e, il s'est développé un Proteus. Le filtrat est inoculé d'autre part sous la dure-mère de 10 lapins. L'un d'eux est mort sans cause connue le 6 novembre (13e jour). Passages négatifs. 8 autres lapins ont contracté la rage du 16e au 20e jour et ont succombé du 18e au 21e. 1 dernier lapin est demeuré indemne.

Grâce à la filtration, il est donc possible d'établir expérimentalement le diagnostic de rage en partant d'un virus putréfié, c'est-à-dire d'un virus impossible à inoculer sous les méninges ou dans la chambre antérieure et délicat à injecter sous la peau ou dans les muscles. Ce procédé pourra peut-être rendre service pour l'isolement du virus rabique dans quelques cas exceptionnels, mais il va de soi qu'on n'est pas plus

autorisé à attendre pour se soumettre au traitement anti rabique le résultat de cette méthode expérimentale que celui de l'inoculation sous-cutanée ou intra-musculaire. On remarquera qu'appliquée à la filtration de produits putréfiés, la bougie Berkefeld V s'est montrée un filtre assez imparfait[1]. Dans le cas particulier, le fait est sans importance, puisqu'il s'agit d'obtenir un diagnostic expérimental et non plus de démontrer que le microbe de la rage est un organisme ultra-microscopique.

2° *Obtention d'un sérum antirabique.* — M. Marie[2] a montré qu'il était possible d'immuniser très solidement le lapin et le cobaye à l'aide d'une seule injection d'un mélange de virus fixe et de sérum anti-rabique.

Ce mélange étant en outre dépourvu de virulence, puisqu'il se montre inoffensif pour les lapins qui en reçoivent dans le cerveau, on conçoit quel progrès serait réalisé pour la vaccination des grands animaux et de l'homme même si cette méthode venait à pouvoir leur être appliquée. De grandes quantités de sérum antirabique seraient alors nécessaires. Or, l'emploi du virus filtré paraît comporter pour l'obtention de ce sérum quelques avantages sur le virus fixe simplement dilué. L'état réfractaire du mouton vis-à-vis du virus rabique inoculé par voie intra-veineuse n'est pas absolu, et on peut — quoique exceptionnellement — voir l'animal succomber à la rage paralytique après une inoculation de 5 c. c. d'une dilution étendue. D'autre part, — indépendamment, cela va de soi, de toute introduction d'air ou de grumeaux — l'inoculation intra-jugulaire d'une dilution, même non concentrée de virus fixe, expose l'animal à la mort subite, ainsi que nous en avons recueilli deux observations. Aucun de ces accidents n'est à redouter avec le virus filtré. Un mouton peut recevoir dans la jugulaire, en une seule fois et sans le moindre inconvénient, de 150 à 200 c. c. de filtrat. Un de nos animaux a été saigné après avoir reçu 1,000 c. c. Les lapins inoculés avec le mélange de virus fixe et de sérum laissé 24 heures en présence sont morts avec un retard de 4 jours sur les témoins. Il avait été observé un retard identique avec le sérum de moutons ayant reçu dans la jugulaire 250 c. c. de virus dilué.

1. Ces bougies sont, du reste, données sans garantie par la maison Berkefeld.
2. A. Marie. Immunisation par des mélanges de virus rabique et de sérum antirabique. *Soc. de Biologie.* Séance du 29 novembre 1903.

3° *Étude de la diffusion du virus rabique post mortem.* — Dans quels organes le virus rabique se localise-t-il? Quels sont, chez un homme ou un animal atteints de rage, les produits virulents? C'est une question sur laquelle les auteurs sont loin d'être d'accord. Ainsi, le pancréas, le lait, le sperme, les capsules surrénales, l'humeur aqueuse sont tour à tour considérés comme pourvus et dénués de virulence. De l'examen des documents sur lesquels s'étayent les opinions en présence, il semble résulter que les expérimentateurs qui ont eu le plus de résultats positifs sont ceux qui ont opéré avec des produits recueillis un temps plus ou moins long après la mort. Ceux qui se sont servis, au contraire, d'un matériel prélevé pendant la vie ou qui ont employé les organes d'un animal sacrifié prématurément n'ont obtenu le plus souvent que des résultats négatifs. Le virus rabique se généraliserait-il *post mortem?* Dans quels organes est-il susceptible de se répandre et dans quelle proportion? La filtration peut mieux que n'importe quel procédé répondre à ces questions. Seule, en effet, elle permet à la fois de se débarrasser des microbes d'infection agonique et d'utiliser la voie sous-dure-mérienne, de beaucoup la plus sensible et la plus précise.

Même en ce qui concerne la virulence de la salive et des glandes salivaires de l'homme atteint de rage, l'opinion des auteurs n'est pas unanime. Les résultats positifs obtenus par Bardach ont été attribués par Bordoni à la diffusion du virus après la mort. Tout récemment, Bertarelli et Volpino ont inoculé à 20 lapins de la salive, puis une émulsion des glandes perotide, sous-maxillaire et subiinguale d'un enfant mort de rage, et ils ont obtenu des résultats négatifs. Le fait suivant cadre avec celui de ces auteurs [1] :

Le 22 octobre 1903, six personnes originaires du vilayet de Salonique sont grièvement mordues à la face et aux mains par un loup enragé. Elles n'arrivent à l'Institut antirabique que le 4 novembre, soit 13 jours après la morsure. Le 17 novembre (14e jour du traitement), apparition chez deux d'entre elles des premiers symptômes de la rage. Pendant toute la journée du 17 et la plus grande partie de celle du 18, on prie les malades de cracher dans un bocal spécial. Le 19, ces deux expectorations sont mélangées, délayées dans 100 c. c. d'eau et filtrées à travers Berkefeld V. Le filtrat est copieusement ensemencé dans 10 tubes de bouillon. 5 sont mis à l'étuve à

1. Cette observation a été communiquée à la Société de Biologie à la séance du 23 janvier 1904.

37°. 5 autres sont laissés à la température de la chambre. Aucun développement. Le filtrat est inoculé d'autre part à la dose de 1 c. c. sous la dure-mère de 8 lapins. Tous ont survécu. Deux autres lapins, inoculés sous la peau avec 2 et 5 c. c. d'émulsion de salive non filtrée, sont également indemnes après trois mois.

La question que soulève cette expérience, comme aussi toute la question de la diffusion du virus rabique *post mortem*, ne pourra être réglée, cela va de soi que par un très grand nombre de recherches. Notre but est, ici, de poser le problème.

X. VIRUS RABIQUE FILTRÉ ET CORPUSCULES DE NÉGRI

Un dernier point reste à examiner. Le passage du virus rabique à travers les filtres est-il compatible avec le parasite trouvé dans la rage par Negri? Cet auteur, dont les travaux ont été confirmés par Guarnieri, Daddi, Celli et de Blasi, Bosc, Bertarelli et Volpino, etc., a décrit, comme on sait, des inclusions protoplasmiques spéciales dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon, les cellules de Pürkinje du cervelet, les grandes cellules des circonvolutions cérébrales des sujets morts de rage. Ces inclusions ne se rencontreraient dans le système nerveux ni des sujets sains, ni des individus ayant succombé à une autre maladie. Elles seraient le Protozoaire spécifique de la rage. Ce Protozoaire, que la méthode de Mann colore en rouge vif, est de taille et de forme très variables. Le plus souvent, il est rond ou ovale avec un diamètre de 4 à 10 μ, mais il est susceptible de prendre des dimensions beaucoup plus considérables 20 à 25 μ) comme aussi beaucoup plus réduites (1/2 à 1 μ). Il semble que les dimensions du parasite puissent être plus petites encore. A côté des inclusions protoplasmiques, le microscope montre dans les cellules nerveuses de fines granulations, à peine visibles, se colorant en rouge par le Mann. Celles-ci ne sont peut-être que des modalités du même parasite. Pour Schuder, le fait que le virus rabique traverse les filtres est incompatible avec le rôle pathogène de ces formations. Après avoir établi que le virus rabique passe à travers son filtre spécial qui retient le vibrion cholérique, il conclut que la taille du parasite de la rage est au-dessous des dimensions susceptibles d'être révélées par les microscopes ordinaires. Par conséquent, le parasite décrit par Négri n'est nullement l'agent spécifique de la maladie. Ce n'est

pas un Protozoaire, mais une inclusion protoplasmique banale. Celli et de Blasi protestent contre cette opinion. Ils font remarquer que, si les formes volumineuses et même moyennes du Protozoaire de Négri sont nécessairement retenues par les filtres, il peut n'en être plus de même des formes petites. De fait, ils ont retrouvé des inclusions protoplasmiques identiques chez des animaux qui avaient succombé à une rage déterminée par du virus filtré. Pareille constatation a été faite également par Négri lui-même[1]... Une question analogue se pose, comme on sait, à propos de la clavelée et de quelques autres affections. Ainsi, M. Bosc a émis l'opinion que les formes très petites du Protozoaire qu'il a décrit dans la clavelée étaient parfaitement capables de traverser les filtres. D'où les propriétés infectieuses du filtrat, découvertes par Borrel. Nous n'avons aucune compétence pour prendre position dans cette question si difficile de l'extrême polymorphisme de certains Protozoaires et de la nature véritable des inclusions protoplasmiques décrites aujourd'hui dans un assez grand nombre de maladies. Contre l'hypothèse parasitaire des corpuscules de Négri, nous ferons seulement observer l'absence de corrélation entre leur distribution et celle du virus rabique. C'est dans le bulbe et la protubérance qu'existe — la chose est classique — la plus grande quantité de virus. Or, à ce niveau, les parasites sont absents pour la majorité des auteurs, extrêmement rares pour les autres. Au contraire, ces corpuscules se rencontrent surtout dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon et de l'écorce cérébrale, dans les cellules de Purkinje du cervelet, là où le virus rabique est relativement peu abondant.

Une petite particularité de nature à faire admettre, par contre, que les « microbes invisibles » constituent bien un groupe spécial, et que la rage doit figurer dans ce groupe, c'est la façon identique dont ces micro-organismes d'une part, le virus rabique de l'autre réagissent à la température. MM. Marchoux et Simond[2] ont fait remarquer que les organismes ultra microscopiques offraient tous à la chaleur une résistance très faible. Ainsi le sang des malades atteints de fièvre jaune perd toute

1. Negri, communication personnelle.
2. Marchoux, et Simond, La fièvre jaune. *Bulletin de l'Institut Pasteur* du 15 janvier 1904.

virulence par un chauffage à 55° de 10 minutes (Reed et Carroll) de 5 minutes (Marchoux, Salimbeni et Simond). Le virus claveleux est détruit en 3 minutes à 56°-58° (Nocard). La virulence de la lymphe aphteuse disparaît après chauffage à 50° pendant 15 minutes. Le chauffage à 52° stérilise en une demi-heure le virus pestique. De même le chauffage à 40 pendant quelques heures (Babès) ou à 47°-48° pendant 10 et même 5 minutes (Galtier) fait perdre au virus rabique toute son activité. Il y a dans ce fait un argument en faveur du rattachement de la rage à un groupe morbide spécial, bien distinct des affections à Protozoaires.

Constantinople, le 20 février 1904.

Recherches sur la coagulation de l'amidon.

Par MM. A. FERNBACH et J. WOLFF

(PREMIER MÉMOIRE)

Malgré les recherches très nombreuses auxquelles a donné lieu l'étude de l'amidon, nous ne savons encore que fort peu de chose sur sa constitution chimique et sur son mode de formation. On doit donc attacher une grande importance à toute observation capable de jeter un peu de lumière sur ce sujet si complexe. L'un de nous, au cours des travaux qu'il poursuit depuis quelques années sur la saccharification de l'amidon par l'amylase du malt, a eu l'occasion d'étudier quelques influences qui favorisent ou retardent la liquéfaction et la transformation ultérieure de l'empois [1]. A la suite de ces recherches, nous avons été conduits à nous préoccuper du phénomène inverse de la liquéfaction de l'empois, c'est-à-dire du retour de l'amidon solubilisé vers la forme solide, et nous avons réussi à réaliser ce retour à l'aide d'une diastase qui semble être aussi répandue dans la nature que l'amylase elle-même. Nous exposons ci-après la première partie de nos recherches sur cette diastase, à laquelle, conformément aux règles de la nomenclature généralement adoptée, nous donnerons le nom d'*amylo-coagulase*.

I

Si la formation de l'amidon solide dans les cellules végétales est un phénomène diastasique, on doit naturellement s'attendre à rencontrer la diastase qui provoque le phénomène au moment où l'amidon apparaît dans le végétal. Nous avons donc été conduits à étudier tout d'abord des céréales en voie de développement et dans lesquelles le grain est encore vert et à l'état de *lait*. Dans la plupart des cas, nos prévisions se sont trouvées réalisées.

D'une manière générale, nous avons fait agir des macérations du grain à étudier sur de la fécule, préalablement solubi-

1. Ces recherches ont été exposées dans une conférence faite par M. A. Fernbach à l'Institut Pasteur et ont été publiées dans les *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, 1899, 5 septembre, 10 et 25 octobre.

lisée par chauffage dans la vapeur d'eau sous pression, et nous nous occuperons presque exclusivement dans ce mémoire de ce qui a trait à la fécule de pommes de terre, réservant pour un mémoire ultérieur l'étude de la manière dont se comportent les amidons d'une autre origine.

Disons d'abord quelques mots de la manière dont nous avons préparé nos solutions d'amidon soluble. De la fécule de pommes de terre du commerce, qu'il est facile de se procurer à l'état de pureté suffisante (toutes nos expériences ont été faites avec le même lot de fécule, bien que, dans quelques cas, nous nous soyons assurés que d'autres échantillons conduisaient exactement aux mêmes résultats), a été transformée en empois à 2 0/0 d'amidon réel, et cet empois a été chauffé dans un autoclave pendant un temps variant entre 3 et 4 heures à une température voisine de 135°-140°. Immédiatement au sortir de l'autoclave, le produit obtenu, ramené au volume primitif et filtré, a été réparti dans de petits ballons, par portions de 100 c. c., qu'on a restérilisés en chauffant pendant 1/4 d'heure à 120°. Nous avons ainsi fait une provision d'amidon soluble permettant d'exécuter un grand nombre d'essais portant tous sur une matière première toujours comparable à elle-même.

Quant aux macérations de grains, elles ont été préparées en broyant les grains avec de l'eau et du sable, et filtrant l'extrait; dans un certain nombre de cas, on a stérilisé le liquide obtenu en le faisant passer au travers d'une bougie de porcelaine. Nous avons pu ainsi contrôler, par des expériences aseptiques, les résultats obtenus avec la macération non filtrée, agissant en présence de chloroforme comme antiseptique.

Comme il fallait s'y attendre, nos premières expériences n'ont pas conduit tout de suite au résultat désiré, et nous avons dû enregistrer un grand nombre d'essais négatifs avant d'avoir trouvé les conditions qui permettent de réussir à coup sûr.

Si on introduit dans une série de tubes à essai, renfermant chacun une même quantité d'amidon soluble préparé comme il a été dit plus haut, des quantités croissantes de macération d'une céréale verte, par exemple d'avoine, et qu'on abandonne ces tubes, additionnés de quelques gouttes de chloroforme, à la température ordinaire, on observe, au bout d'un temps plus ou moins long, l'apparition d'un trouble qui est d'abord léger et

qui va en s'accentuant de plus en plus. Le temps au bout duquel ce trouble apparaît peut varier dans de très larges limites, et, dans nos premières expériences, il ne s'est souvent manifesté qu'au bout de 24 ou même 48 heures; quelquefois même, nous ne l'avons pas observé. La proportion de macération employée joue, en effet, un rôle capital dans la rapidité d'apparition du phénomène, observation qui semble toute naturelle lorsqu'il s'agit d'un phénomène diastasique, et qui serait superflue ici si le phénomène ne se compliquait pas de circonstances particulières sur lesquelles nous attirerons plus loin l'attention.

Lorsqu'on opère comme nous venons de le dire sur une série de tubes recevant des quantités croissantes de macération, il arrive que deux ou trois tubes successifs se troublent à peu près au bout du même temps, alors que ceux qui les précèdent dans la série se troublent beaucoup plus tard, les premiers pouvant même rester inaltérés si la proportion de macération a été insuffisante. Les tubes qui suivent dans la série ceux où il y a eu coagulation ne se troublent pas non plus ; ils subissent néanmoins une transformation qui se traduit par la disparition complète de l'opalescence que présentent toujours à froid les solutions d'amidon soluble. Nous n'avons pas tardé à reconnaître que, dans ces derniers tubes, l'amidon disparaissait peu à peu par saccharification; que dans tous les autres tubes où s'était manifesté le trouble il y avait également une saccharification, d'autant moins avancée qu'on remontait plus en arrière dans la série, et que cette saccharification était due à la présence d'amylase. Cette action saccharifiante progressive était facile à constater aussi bien par la réaction avec l'iode qu'à l'aide de la liqueur de Fehling.

Toutes les macérations sur lesquelles nous avons expérimenté se sont comportées de même : chaque fois que nous avons pu mettre en évidence l'amylo-coagulase, nous avons constaté la présence d'amylase. Le fait s'est vérifié pour des macérations de blé vert, d'avoine verte ou d'orge verte de diverses provenances, de feuilles de trèfle. Exceptionnellement nous n'avons pas réussi à déceler ni diastase coagulante ni amylase dans un échantillon de maïs vert, qui n'a sans doute pas été étudié au moment favorable [1].

1. Cette explication nous est suggérée par un fait analogue que nous avons

Ayant ainsi constaté la présence simultanée et constante de la propriété coagulante et de la propriété saccharifiante, nous avons été conduits à rechercher si l'amylo-coagulase ne se trouverait pas associée à l'amylase dans le malt, et nous l'avons en effet rencontrée dans le malt vert, comme dans le malt touraillé. Nous avions ainsi sous la main un produit qu'il est facile de se procurer et de conserver semblable à lui-même, de sorte que nous nous sommes décidés à poursuivre l'étude de la diastase coagulante en nous servant de macérations de malt, à l'aide desquelles il était possible de faire des expériences comparatives et d'établir les conditions précises dans lesquelles le phénomène de la coagulation de l'amidon se produit à coup sûr.

II

Nous décrivons ci-après des expériences destinées à préciser les conditions nécessaires à la coagulation de l'amidon.

10 grammes de malt [1] finement moulu sont mis à macérer pendant 4 heures au minimum, à la température ordinaire, dans 100 c. c. d'eau. On agite de temps à autre pendant la macération. Le liquide filtré est étendu de trois fois son volume d'eau.

Dans une série de tubes renfermant chacun 10 c. c. d'amidon soluble à 2 0/0 préparé comme il a été dit plus haut, on ajoute des volumes croissants de cet extrait de malt dilué, en commençant par 0,05 c. c. [2], et augmentant par fraction de 0,05 c. c. Deux séries de tubes semblables sont placées, l'une à la température de 22°, l'autre à la température de 8°. Chaque série renferme plusieurs tubes témoins additionnés de la solution diastasique préalablement bouillie [3].

eu l'occasion d'observer pendant la germination du riz. Nous avons constaté que la production d'amylase dans cette céréale ne peut être mise en évidence qu'à un stade bien déterminé de sa germination et qu'à ce moment il y en a assez pour saccharifier tout l'amidon du grain; le grain de riz étudié plus tôt ou plus tard ne renferme plus que des quantités d'amylase presque insignifiantes.

1. Le malt qui nous a servi dans la majeure partie de nos expériences était du malt simplement séché sur le plateau supérieur de la touraille. Il renfermait 12 0/0 d'humidité et avait un pouvoir diastasique (déterminé par la méthode de Lintner et rapporté au grain sec) s'élevant à 80.

2. Nous avons employé pour ces mesures un compte-gouttes Duclaux, dont la goutte mesure 1/20e de centimètre cube. Comme il s'agissait de mesurer un extrait de malt très dilué, la mesure peut être considérée comme aussi précise que s'il s'était agi d'eau distillée.

3. Dans toutes les expériences qui n'ont pas été faites aseptiquement avec des tubes stériles et de la solution diastasique stérilisée par filtration, on a toujours ajouté quelques gouttes de chloroforme. Nous nous sommes assurés que le chloroforme n'exerce aucune influence sur la marche du phénomène.

A la température de 22° on constate, au bout de 15 heures, une coagulation légère dans les tubes qui ont reçu 0,1 c. c. et 0,15 c. c. d'extrait de malt.

A la température de 8°, au bout du même temps, tous les tubes se sont troublés abondamment, à partir de celui qui a reçu 0,1 c. c. d'extrait de malt, jusqu'au dernier, qui en a reçu 0,35 c. c. Il ne s'est produit aucun changement dans les tubes témoins.

En maintenant à 8° le premier tube, qui ne s'est pas troublé au bout de 15 heures, on constate qu'il finit également par donner une coagulation.

La conclusion à tirer de ces expériences est que, toutes choses égales d'ailleurs, la coagulation se produit mieux à 8° qu'à 22°. Nous essaierons plus loin de préciser l'influence de la température. On voit aussi que pour une température donnée une quantité minimum de solution diastasique est nécessaire à la production du phénomène, et que si on dépasse une certaine dose de solution diastasique, la coagulation ne se produit plus.

On peut déduire des expériences qui viennent d'être rapportées et d'autres qu'il est inutile de citer ici que, pour produire à coup sûr la coagulation de 100 c. c. d'amidon soluble à 2 0/0, il faut un volume d'extrait de malt dilué, préparé de la manière indiquée plus haut, compris entre 1 c. c. et 1,5 c. c., si on opère à 22°, et entre 1 c. c. et 8 c. c. si on opère à 8°. Les limites entre lesquelles on peut se mouvoir sont d'autant plus étendues que la température est plus basse.

Après avoir précisé ainsi les conditions nécessaires et suffisantes pour produire une coagulation, nous avons à démontrer qu'il s'agit bien ici d'une action diastasique.

La première preuve d'une action diastasique est déjà fournie par les expériences citées plus haut, puisque nous avons constaté que la macération bouillie a perdu tout pouvoir coagulant. D'autre part, l'amylo-coagulase partage avec l'amylase la propriété de résister à la chaleur sèche, puisque, comme nous l'avons dit, on la retrouve dans le malt touraillé. L'ébullition n'est pas nécessaire pour faire disparaître la propriété coagulante de l'extrait de malt. Voici un tableau qui indique ce que cette propriété devient à diverses températures :

70°	2 minutes	Destruction totale
65°	5 —	—
64°	5 —	—
63°	5 —	—
60°	1/4 d heure	Diastase intacte

La température de destruction, dans l'extrait de malt, est donc comprise entre 60° et 63°.

Comme c'est le cas pour un grand nombre de diastases, et en particulier pour l'amylase, le passage au travers d'un filtre de porcelaine diminue considérablement les propriétés coagulantes de l'extrait de malt.

Voici encore une observation qui s'accorde avec l'idée d'une action diastasique. En ajoutant, comme dans les expériences décrites plus haut, des quantités croissantes d'extrait de malt dans une série de tubes contenant chacun 10 c. c. d'amidon soluble, nous avons observé que le commencement de la coagulation se manifestait au bout des temps indiqués ci-après :

Volumes d'extrait de malt employés.	Quantités relatives d'extrait de malt.	Temps.
—	—	—
0 c. c. 05	1	16 h.
0 c. c. 15	3	9 h.
0 c. c. 30	6	5 h.
0 c. c. 45	9	4 h.
0 c. c. 60	12	2 h. 1/2

On ne peut pas s'attendre, comme on l'observe pour la présure, à une proportionnalité inverse entre le temps et les quantités de diastase. Pour la présure, cette relation n'est qu'approchée, parce que la mesure du temps de coagulation est grossière. Ici la mesure est encore plus inexacte et n'a, d'ailleurs, été faite qu'en observant le moment où *commence* la coagulation ; le phénomène dure toujours un certain temps, et sa fin est impossible à saisir avec précision. De plus, il se complique de la présence de l'amylase. Il n'en apparaît pas moins très nettement que le phénomène est d'autant plus lent à se produire qu'il y a moins de solution diastasique employée. En outre, si on détermine la quantité d'amidon précipité lorsque la coagulation est terminée, quand celle-ci est lente, comme dans les expériences ci-dessus, on trouve que ces quantités variables de solution diastasique ont produit des poids de précipité sensiblement égaux.

On trouvera plus loin des expériences destinées à établir l'influence de la concentration de l'amidon, expériences qui

montrent que le phénomène est d'autant plus rapide que la solution d'amidon est plus concentrée. Mais nous devons attirer de suite l'attention sur ce fait que la concentration n'est pas le seul facteur qui influe sur la rapidité de la coagulation, et que l'état de l'amidon joue aussi un rôle capital. Lorsqu'on chauffe de l'empois à l'autoclave, sa précipitation par l'amylo-coagulase devient d'autant plus lente que la température a été plus élevée et que le chauffage a été plus prolongé ; ce qui revient à dire que l'amidon est d'autant plus facilement coagulable que sa solubilisation a été poussée moins loin. Voici, en effet, des expériences dans lesquelles nous avons réalisé des coagulations beaucoup plus rapides que celles mentionnées plus haut, en partant également de solutions à 2 0/0 d'amidon réel, chauffées à l'autoclave à des températures moins élevées. Ces coagulations ont été faites à la température de 16°, sur 10 c. c. de solution d'amidon, avec de l'extrait à 10 0/0 d'un malt dont le pouvoir diastasique (rapporté au grain sec) était 50. Les chiffres de la colonne A correspondent à de l'empois chauffé à 115° pendant 10 minutes, et ceux de la colonne B au même empois chauffé à 130° pendant 3 heures.

Volume d'extrait de malt.	Quantités relatives d'extrait de malt.	Temps au bout duquel la coagulation commence.	
—	—	A	B
0 c. c. 05	1	98 minutes	170 minutes
0 10	2	93 —	165 —
0 15	3	80 —	140 —
0 20	4	65 —	125 —
0 25	5	50 —	110 —
0 30	6	45 —	105 —

Contrairement à ce que nous avons signalé dans l'expérience rapportée plus haut, où les temps de coagulation ont été relativement longs, nous avons constaté, dans les expériences que nous venons de citer, que le coagulum est d'autant moins abondant que la quantité de solution diastasique employée a été plus grande, ce qui pourrait sembler paradoxal s'il s'agissait ici d'une diastase agissant toute seule, et trouvera son explication plus loin, lorsque nous parlerons de l'antagonisme de l'amylo-coagulase et de l'amylase.

L'aspect de l'amidon coagulé varie suivant les conditions dans lesquelle sa précipitation s'est faite. Si elle a lieu rapidement, on peut facilement suivre la marche du phénomène et

d'autant mieux que la solution d'amidon est plus concentrée : on voit d'abord apparaître un louche qui va en augmentant de plus en plus, et qui ne tarde pas à se résoudre en flocons qui envahissent peu à peu toute la masse, et qui lui donnent l'apparence du lait caillé.

Si la coagulation a lieu très lentement, c'est-à-dire dans une solution d'amidon diluée et avec une trace de diastase, auquel cas il devient indispensable d'opérer aseptiquement, il se forme peu à peu un précipité pulvérulent blanc qui se dépose à la longue et que la moindre agitation suffit à remettre en suspension. Dans le premier cas, on trouve au microscope, en faisant l'examen au moment où il ne reste plus d'amidon en solution, une agglomération de granules punctiformes, très peu réfringents, et qu'on n'arrive à distinguer facilement que si on les colore par l'iode. Dans le second cas, ces granules sont mélangés d'une proportion plus ou moins considérable d'amas volumineux, formés par des granules beaucoup plus gros, parmi lesquels on en rencontre souvent qui présentent une forme sphérique ou ovoïde rappelant par leurs dimensions les grains les plus petits de la fécule de pomme de terre.

III

La présence simultanée de l'amylo-coagulase et de l'amylase, que nous avons toujours constatée dans les macérations que nous avons étudiées, devait naturellement faire rechercher si l'action coagulante ne pourrait pas être attribuable à une réversibilité de l'action liquéfiante de l'amylase. L'observation qui suit nous a amenés à rejeter cette hypothèse. Ainsi qu'on l'a vu plus haut, le pouvoir coagulant de l'extrait de malt disparaît lorsqu'on chauffe cet extrait à 63° pendant 5 minutes, alors que ce traitement laisse intact le pouvoir liquéfiant de ce même extrait ; on sait même, depuis les travaux de Pottevin, que ce pouvoir liquéfiant subsiste encore lorsque l'extrait de malt a été chauffé pendant 1/4 d'heure à 80°. Il ne peut donc être question d'une identité entre les deux diastases.

Mais, comme ces deux diastases sont toujours présentes en même temps, il en résulte un antagonisme qui rend l'étude de la coagulase particulièrement difficile. Les essais que nous avons

rapportés plus haut font voir que des modifications minimes des conditions expérimentales empêchent ou permettent la coagulation. Cette contingence des résultats s'explique facilement par l'antagonisme, dont nous venons de parler, entre l'amylo-coagulase et l'amylase. Plus la température s'élève, et plus l'action de l'amylase se trouve favorisée; cette action saccharifiante diminue de plus en plus la concentration de la solution d'amidon, et il s'ensuit que l'action de l'amylo-coagulase est de plus en plus retardée, car, ainsi que nous le montrerons plus loin, l'action de cette dernière diastase est, toutes choses égales d'ailleurs, d'autant plus facile que les solutions d'amidon sont plus concentrées. Nous pouvons également prévoir que toute influence qui tendra à restreindre l'action de l'amylase sans gêner celle de la coagulase permettra à celle-ci de s'exercer plus librement, et, à défaut de toute méthode de séparation des deux diastases, c'est là le seul moyen que nous ayons à notre disposition pour dissocier leurs actions.

Quelques données expérimentales suffiront pour éclairer les considérations qui précèdent. Nous avons déjà vu réussir à 8° des coagulations d'amidon à 2 °/₀ qui, toutes choses égales d'ailleurs, ne se produisent plus à 22°. Si on élève la température, jusqu'à 26° par exemple, il devient impossible de réussir les coagulations que nous pouvions produire à 22°. C'est ainsi que s'explique l'irrégularité de nos premières expériences, qui, faites pendant l'été, ont donné des résultats tantôt positifs, tantôt négatifs, suievant que la température était plus ou moins favorable.

Cet antagonisme des deux diastases explique encore pourquoi il sera impossible de déterminer avec précision l'optimum de température de l'amylo-coagulase tant que nous n'aurons pas trouvé un moyen d'arrêter complètement l'action de l'amylase sans nuire d'une manière sensible à l'action de la coagulase.

Il ne faudrait cependant pas conclure de ce que nous venons de dire à propos de l'antagonisme de l'amylo-coagulase et de l'amylase que l'une de ces diastases soit capable de défaire ce que l'autre a fait. Nous reviendrons plus tard sur ce point, mais nous pouvons dire tout de suite que l'amidon solubilisé par l'amylase ne se prête pas à la coagulation aussi facilement que

l'amidon solubilisé sous pression, bien que, à d'autres points de vue, ces deux amidons se comportent d'une manière identique.

Les essais, faits à diverses températures, que nous avons rapportés plus haut, nous ont montré que l'action coagulante l'emporte sur l'action saccharifiante à mesure que la température s'abaisse. Il était indiqué de rechercher d'autres moyens capables de favoriser l'action de l'amylo-coagulase, et nous nous sommes demandé si nous ne pourrions pas trouver ces moyens dans l'étude de l'influence des acides, des alcalis ou de certains sels.

Dans cette étude nous avons rencontré une difficulté résultant de la lenteur avec laquelle la coagulation se produit lorsqu'on opère à température basse sur des solutions d'amidon à 2 0/0 solubilisé à haute température, que nous avions employé exclusivement au début de nos recherches. Cette lenteur nous eût obligés à opérer toujours aseptiquement, ce qui est une complication lorsqu'il s'agit de faire simultanément un grand nombre d'expériences; d'ailleurs ces expériences aseptiques sont encore beaucoup plus lentes, parce qu'on opère avec une solution diastasique dont l'activité est considérablement réduite par la filtration. Nous avons donc été conduits à opérer sur des solutions d'amidon soluble renfermant entre 4 et 4, 5 0/0 d'amidon réel. Disons de suite en quoi la coagulation de ces solutions concentrées diffère de celle qu'on observe sur les solutions diluées.

Ces solutions d'amidon à 4-4, 5 0/0 sont généralement beaucoup plus épaisses et opalescentes que la solution à 2 0/0, et elles se prennent en gelée spontanément si on les abandonne à elles-mêmes pendant 24 ou 48 heures [1], phénomène qui peut aussi se produire dans les solutions à 2 0/0, mais au bout d'un temps très long, qui est rarement inférieur à un mois. Cette tendance à la solidification ne gêne pas l'étude de l'action de l'amylo-coagulase, puisque les coagulations produites dans ces solutions concentrées ont lieu au bout d'un temps très court, si on augmente suffisamment la proportion de solution diastasique. Ces coagulations présentent d'ailleurs l'avantage de se produire très bien à la température ordinaire, entre 15° et 25°.

1. La solution se conserve à l'état liquide d'autant plus longtemps qu'elle a été chauffée plus haut et que le chauffage a été plus prolongé. Nous avons pu conserver des solutions pendant 4 ou 5 jours avant qu'elles se prennent en gelée.

Pour 10 c. c. de cet amidon à 4-4,5 0/0, nous avons pu employer 0,5 c. c., d'une macération de malt à 10 0 0, c'est-à-dire 20 fois plus que dans les premières expériences que nous avons citées. Dans ces conditions la coagulation se produit au bout d'une demi-heure environ, et le contenu des tubes se prend très rapidement en grumeaux volumineux.

C'est en opérant de cette manière que nous avons fait quelques essais relatifs à l'influence de la réaction acide et de la réaction alcaline. Nous avons étudié ainsi l'influence de l'acide acétique et de l'acide sulfurique, ainsi que l'influence de la soude. Voici un tableau qui résume les résultats obtenus:

Corps étudié	Dose en millionièmes (Milligr. p. litre).	Effet.
—	—	—
Acide acétique	1	Aucun
—	10	Retard sensible
—	100	Faible coagulation
Acide sulfurique	75	Pas de coagulation
Soude	20	Retard sensible
—	80	Retard de quelques heures
—	200	Pas de coagulation

Nous considérons les expériences dont nous venons de parler comme étant surtout des expériences d'orientation, et nous nous proposons de les reprendre en les étendant à un certain nombre de sels et à de l'amidon à divers états de solubilisation [1]. Nous avons cependant été conduits à essayer l'influence des sels de chaux, qui, comme on le sait, jouent dans tous les phénomènes de coagulation étudiés jusqu'ici un rôle capital. Mais jusqu'à présent les résultats de nos essais ont été négatifs.

La conclusion qui se dégage des expériences ci-dessus, c'est que l'amylo-coagulase subit, comme l'amylase, l'influence de la moindre trace d'acide ou d'alcali *libre*. Elle apparaît, dans les conditions où nous venons d'opérer, comme notablement moins sensible à l'action des alcalis que l'amylase. Cette constatation nous a naturellement conduits à essayer l'influence de la soude pour arriver à dissocier l'action des deux diastases simultanément présentes.

Nous pouvions prévoir, d'après ce que nous avons dit plus

1. Nous avons, en effet, eu l'occasion de constater que les doses qui sont gênantes pour la coagulation d'un certain amidon peuvent devenir favorisantes lorsque l'état de solubilisation de ce même amidon est différent. Il y a là une influence évidente de l'état physique, dont nous avons déjà cité un exemple quand nous avons parlé des temps de coagulation, état physique qui, lorsqu'il s'agit d'un ensemble aussi complexe que l'amidon, joue un rôle aussi important dans l'action diastasique que la diastase elle-même.

haut, qu'en retardant ainsi l'action de l'amylase, nous augmenterions la quantité d'amidon qui échappe à la saccharification, et que, par contre-coup, nous aurions une plus forte proportion d'amidon coagulé.

Voici les résultats de quelques expériences qui établissent nettement l'influence favorisante de la soude, expériences dans lesquelles nous avons également, dans quelques cas, fait varier la proportion de solution diastasique employée. Toutes ces expériences ont été faites à la température du laboratoire, 15-20°.

Expérience I. — Deux ballons, A et B, renfermant 50 c. c. d'amidon soluble, à 4 0 0 d'amidon réel, préparé à 130° pendant 2 heures, ont été additionnés chacun de 2 c. c. 5 d'extrait de malt à 10 0/0; le ballon B a reçu en plus 1 c. c. de soude décinormale, représentant 80 millionièmes.

	A	B
Volume de solution d'amidon	50 c. c.	50 c. c.
Poids de l'amidon primitif	2 gr.	2 gr.
Volume d'extrait de malt à 10 0/0. . .	2 c.c. 5	2 c.c. 5
Soude en millionièmes.	Néant	80
Poids de coagulum, en milligrammes. .	288	483
Proportion centésim. d'amidon coagulé.	14,4 0/0	24,15 0/0

Expérience II. — Cette expérience a été faite comme la précédente, mais en variant les quantités de solution diastasique.

	A	B	C
Volume de solution d'amidon	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.
Poids de l'amidon primitif	2 gr. 22	2 gr. 22	2 gr. 22
Volume d'extrait de malt à 10 0/0. . .	2 c.c. 5	0 c.c. 5	0 c.c. 5
Soude en millionièmes	Néant	Néant	80
Proportion centésim. d'amidon coagulé.	18,5 0/0	23,8 0/0	26,5 0/0

Expérience III.

	A	B	C	D	E
Volume de solution d'amidon. .	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.
Poids de l'amidon primitif . . .	2 gr.25	2 gr.25	2 gr.25	2 gr.25	2 gr.25
Volume d'extrait de malt à 20 0/0	2 c.c.5	—	—	—	—
— — à 10 0/0	—	2 c.c.5	2 c.c.5	1 c. c.	1 c. c.
Soude en millionièmes	80	Néant	80	Néant	80
Propor. cent. d'amidon coagulé.	17,42 0/0	13,4 0/0	20,7 0/0	16,45 0/0	21,04 0/0

Ces expériences montrent nettement l'influence favorable de la soude à la dose de 80 millionièmes. Nous voulons dire par là, comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, que la soude favorise le phénomène de la coagulation, mais cette affirmation ne préjuge rien sur ce que serait l'effet de la soude si l'amylocoagulase agissait seule.

Elles font voir, en outre, l'influence des quantités de solution diastasique : les ballons A, dans les trois expériences, et le ballon B, dans l'expérience III, ont reçu des quantités de macération exagérées, de sorte que l'amylase a pris une part

importante au phénomène et que la proportion de coagulum s'en est trouvée réduite.

Nous ajoutons ci-après les chiffres relatifs à deux séries d'expériences dans lesquelles nous avons étudié l'influence de la température et celle du temps.

EXPÉRIENCE IV.

	A	B	C
		Températures.	
	15°	15°	8°
	—	—	—
Volume de solution d'amidon.	50 c.c.	50 c.c.	50 c.c.
Poids de l'amidon primitif	2 gr. 03	2 gr. 03	2 gr. 03
Volume d'extrait de malt à 10 0/0 . . .	1 c. c.	0 c. c. 5	1 c. c.
Proport. centésim. d'amidon coagulé.	20,2 0/0	23,8 0/0	23,37 0/0

Cette expérience montre en même temps l'influence de la température et celle de la quantité de solution diastasique : à 8°, il se forme plus de coagulum qu'a 15°; à 15°, il se forme plus de coagulum avec 0 c. c. 5 de solution diastasique qu'avec une quantité double.

EXPÉRIENCE V.

	A	B	C	D
		Températures		
	33°	18°	18°	10°
	—	—	—	—
Temps au bout duquel le coagulum a été étudié	45 min.	45 min.	2 heures	45 min.
Volume de solution d'amidon.	50 c.c.	50 c. c.	50 c. c.	50 c. c.
Poids de l'amidon primitif	2gr.196	2gr.196	2gr.196	2gr.196
Volume d'extrait de malt à 10 0/0. . .	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Proportion centésim. d'amidon coagulé.	très faible	10 0/0	16,26 0/0	16,26 0/0

Cette expérience montre, en dehors de l'influence de la température qui est mise en lumière par les essais précédents, qu'on coagule la même proportion d'amidon en 45 minutes à 10° qu'en deux heures à 18°.

Après avoir indiqué les résultats obtenus, nous devons décrire rapidement la méthode par laquelle nous avons déterminé la quantité d'amidon coagulé. La pesée directe du coagulum offre de grandes incertitudes, parce qu'il est très difficile de le laver à fond. Nous avons, par suite, été conduits à l'évaluer par différence, en dosant l'amidon existant dans la solution primitive et celui qui restait dans le liquide filtré après coagulation. Dans chacun de ces cas, l'amidon a été saccharifié sous pression par l'acide sulfurique à 1 0/0, et la quantité d'amidon été déduite par le calcul de la quantité de glucose, dosée par la

méthode de Lehmann modifiée par Maquenne. Dans chaque expérience, la quantité totale de glucose obtenue a été corrigée de celle qui provenait de l'extrait de malt. On a tenu compte également du volume, toujours très faible, de soude ajoutée.

IV

La présence simultanée dans l'extrait de malt des propriétés coagulantes et saccharifiantes pourrait faire naître l'idée que la coagulation est une conséquence de la saccharification et n'a pas besoin, pour se produire, d'une diastase spéciale. Elle s'expliquerait alors par une modification du milieu, produite sous l'influence de l'amylase, modification qui aurait pour effet une précipitation de l'amidon. Nous avons fait une série d'expériences destinées à étudier si cette manière de voir est admissible. Certaines expériences exposées plus haut nous ont déjà appris d'ailleurs que l'extrait de malt peut très bien produire, au-dessus de 25°, une saccharification très active, sans que cette saccharification donne lieu à une coagulation; nous savons aussi que l'extrait de malt, chauffé à 63°, produit encore la saccharification, sans pouvoir produire de coagulation, même si on se place dans les conditions les plus favorables à l'apparition du phénomène. Mais on peut nous objecter que, dans les expériences que nous venons de rappeler, la proportion des produits de la saccharification, maltose et dextrine, n'est pas la même que celle qui se forme dans les cas où nous constatons une coagulation. Voici une expérience dans laquelle les proportions d'amidon, de maltose et de dextrine sont celles qui existent au moment d'une coagulation, et qui, cependant, ne donne lieu à aucune précipitation d'amidon.

Une solution à 4 0/0 d'amidon réel, solubilisé à 130° pendant 2 heures, a été coagulée comme à l'ordinaire (1 c. c. d'extrait de malt à 10 0/0 pour 50 c. c.), puis filtrée. Le liquide filtré a été porté à l'ébullition pour détruire les diastases, puis refroidi. Ce liquide a été mélangé avec son volume de la solution d'amidon primitive; le mélange contenait dès lors un peu plus de 2 0/0 d'amidon. Nous n'avons observé dans ce mélange aucune précipitation; par contre, le même mélange additionné d'extrait de malt s'est coagulé comme à l'ordinaire.

Nous avons fait, d'autre part, des mélanges de la solution d'amidon soluble avec des proprotions variables du même liquide séparé du coagulum par filtration, en ramenant toujours l'amidon à la même concentration, et nous n'avons jamais observé de coagulation, en dehors de l'addition d'extrait de malt. Nous avons été conduits exactement aux mêmes résultats négatifs en mélangeant de l'amidon soluble à 4 0/0 avec le même amidon préalablement saccharifié par l'extrait de malt à diverses températures. Signalons en passant que le maltose seul, loin de favoriser l'action de l'amylo-coagulase, la gêne et peut même l'empêcher, si on l'emploie à dose massive, et qu'il en est de même du produit concentré de la saccharification de l'amidon par l'amylase.

V

Quelle est la nature du produit résultant de la coagulation des solutions d'amidon par l'amylo-coagulase? Nous nous contenterons de donner des indications sommaires à ce sujet, parce que nous avons rencontré un certain nombre de faits nouveaux qu'il est préférable d'exposer ultérieurement dans leur ensemble.

Si l'on traite par l'eau bouillante, aussitôt après sa formation, le coagulum séparé du liquide dans lequel il s'est produit, ou si on le fait bouillir au sein de ce liquide, il se dissout intégralement ou ne laisse qu'un résidu insignifiant. Par le refroidissement, la solution se trouble, et le trouble se résout rapidement en un précipité floconneux plus ou moins abondant, qui ne représente jamais qu'une fraction du coagulum primitif.

Tels étaient les faits que nous avions observés [1], lorsque M. Maquenne, par une note insérée aux *Comptes Rendus* (t. CXXXVII, p. 797), nous a fait connaître un côté du problème qui n'avait pas jusque-là attiré notre attention. M. Maquenne, dans le travail auquel nous venons de faire allusion, développe des faits, déjà signalés par lui antérieurement (ibid., t. CXXXVII, p. 88), relatifs au phénomène qu'il a désigné sous le nom de *rétrogradation* de l'empois de l'amidon. L'amidon *rétrogradé* de M. Maquenne (*amylo-cellulose* de Brown et Heron) prend naissance lorsqu'on abandonne à lui-même de l'empois d'amidon stérile, et se forme d'autant plus facilement que l'empois est

1. *C. R.*, t. CXXXVII, p. 718.

plus concentré et a été chauffé moins haut. Il est caractérisé par la résistance qu'il oppose à la saccharification par l'extrait de malt et par les acides minéraux ; il ne se colore pas en bleu par l'iode, mais prend la propriété de se colorer lorsqu'il a été dissous dans un alcali et que la solution a été neutralisée par un acide fort, ainsi que nous l'avons signalé dans une note publiée en commun avec M. Maquenne (*C. R.*, t. CXXXVIII, p. 49). Cette propriété permet de décéler la présence de l'amylo-cellulose, et même de juger de la quantité d'amylocellulose par l'importance du dépôt bleu que ce corps fournit au bout d'un certain temps, après la coloration dont nous venons de parler.

Nous avons ainsi été amenés à constater la présence de l'amylocellulose dans le coagulum qui se forme sous l'influence de l'amylo-coagulase et à reconnaître que le précipité floconneux dont nous avons parlé tout à l'heure présente les propriétés de l'amylocellulose [1]. Cette amylocellulose constitue une portion très variable du coagulum ; les divers états sous lesquels elle se trouve dans le coagulum, à côté d'amidon précipité présentant encore les propriétés de l'amidon soluble primitif, sont eux-mêmes sujets à de grandes variations. Nous nous contenterons de donner une idée des variations dans sa proportion en signalant des chiffres extrêmes choisis dans un très grand nombre de déterminations :

Exp. I.	Amidon coagulé total. .	19 0/0	de l'amidon	primitif.
	Non saccharifiable à 67°.	3,39 0/0	—	—
Exp. II.	Amidon coagulé total. .	25,2 0/0	—	—
	Non saccharifiable à 65°.	12,49 0/0	—	—

Ces différences considérables dans la composition du coagulum produit par l'amylo-coagulase sont dues à l'intervention d'un très grand nombre de facteurs, tels que température, temps, état de l'amidon mis en expérience, réaction du milieu. C'est le rôle de ces divers facteurs que nous nous proposons d'exposer dans un mémoire ultérieur.

1. Nous employons ce terme avec la signification que lui attribue M. Maquenne, et, pas plus que lui, nous ne voulons indiquer par là un corps bien défini, mais bien un ensemble complexe, pour lequel le nom d'*amylo-celluloses* nous semblerait plus correct. Le terme *amidon* comporterait d'ailleurs une observation du même ordre.

Etudes sur les microbes nitrificateurs

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

PAR MM.

E. BOULLANGER ET L. MASSOL

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille. Attaché à l'Institut Pasteur de Lille

Nous avons étudié, dans un précédent mémoire[1], l'influence de la concentration saline sur le travail des microbes nitrificateurs. Ces premières expériences n'ont porté que sur un seul sel ammoniacal, le sulfate d'ammoniaque, et sur les nitrites et nitrates alcalins ou alcalino-terreux. Nous avons cherché depuis à compléter ces recherches par l'étude de la formation des divers nitrites et de la nitrification des divers sels ammoniacaux par le ferment nitreux, ainsi que de l'oxydation des divers nitrites par le ferment nitrique.

Formation de divers nitrites par le ferment nitreux. — On peut d'abord se demander si toutes les bases carbonatées peuvent être indifféremment employées pour saturer l'acide nitreux formé par le microbe, et si les divers nitrites ainsi obtenus n'ont pas une action nocive sur la nitrification. Pour élucider cette question, nous avons remplacé dans le milieu ordinaire à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque le carbonate de magnésie par un autre carbonate, de manière à former ainsi le nitrite correspondant à la base carbonatée.

Nous avons pu ainsi constater la nitrification du sulfate d'ammoniaque en présence des carbonates de magnésium, de calcium, de baryum, de strontium, de zinc, de plomb, de nickel, de manganèse, de cuivre, de fer, de bismuth, etc. Le ferment nitreux peut donc s'accommoder parfaitement de toutes les bases carbonatées communes.

Nitrification des divers sels ammoniacaux. — Dans les milieux où s'exerce dans la nature l'action du ferment nitreux, l'ammoniaque peut se trouver combinée à un très grand nombre d'acides minéraux ou organiques. Il est dès lors intéressant de savoir si

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVII, 1903, p. 492.

ces divers sels ammoniacaux subissent également la fermentation nitreuse, et si les acides auxquels l'ammoniaque se trouve combinée, en particulier les acides organiques, n'exercent pas sur le microbe une influence défavorable.

Pour résoudre ce problème, nous avons essayé de faire nitrifier un certain nombre de sels d'ammoniaque. La proportion employée pour chaque sel correspondait à $0^{gr},257$ d'ammoniaque par litre, ce qui équivaut à une dose de 1 gramme par litre de sulfate d'ammoniaque.

Dans ces conditions, nous avons obtenu une nitrification complète avec les sels d'ammoniaque suivants : arséniate, azotate, azotite, borate, bromure, carbonate, chlorure, fluorure, hyposulfite, phosphate, phosphate ammoniaco-magnésien, sulfate, sulfite, sulfure, acétate, formiate, lactate, malate, succinate, tartrate et urate. L'arsénite, l'iodure, le citrate et l'oxalate ne nitrifient qu'à une dose plus faible ($0^{gr},5$ à 1 gramme par litre).

Le chlorhydrate d'hydroxylamine n'est pas attaqué par le ferment nitreux, même aux doses faibles.

Le ferment nitreux est peu sensible à certains sels qui présentent, pour les autres microbes, des propriétés antiseptiques : par exemple, les solutions de borate et de fluorhydrate d'ammoniaque à 2 grammes par litre nitrifient très rapidement.

Des expériences complémentaires nous ont permis de voir qu'on pouvait augmenter beaucoup la proportion de la plupart des sels organiques d'ammoniaque sans gêner la nitrification. Ainsi ferment nitreux transforme entièrement le lactate, le malate et le le succinate d'ammoniaque à la dose de 10 grammes par litre; le tartrate, l'acétate, le formiate et l'urate à la dose de 6 grammes. Les nitrites formés dans ces conditions nitrifient également sans difficultés par le ferment nitrique.

Nous pouvons donc conclure que les microbes de la nitrification sont peu sensibles à la présence de certaines substances organiques, telles que les sels des acides organiques communs, et qu'il n'est pas nécessaire que ces sels soient au préalable décomposés par des microbes pour que la nitrification puisse s'implanter dans les liquides qui les contiennent.

Nitrification de divers nitrites par le ferment nitrique. — Il restait à voir si le ferment nitrique peut nitrifier la plupart des nitrites. Voici ce que nous avons observé sous ce rapport :

A la dose de $0^{gr},5$ à 1 gramme par litre, le ferment nitrique oxyde à peu près tous les nitrites. Nous avons expérimenté avec les nitrites de potassium, de sodium, de calcium, de magnésium, de baryum, de zinc, de plomb, de manganèse, de cuivre, etc., et nous avons observé partout une nitrification complète. Donc, dans la pratique, la base à laquelle est combiné l'acide nitreux n'a que peu d'importance ; cependant, l'oxydation paraît se faire plus aisément avec les nitrites alcalins ou alcalino-terreux, surtout à forte dose.

*
* *

Pour étudier de plus près l'oxydation des sels ammoniacaux et des nitrites par les microbes nitrificateurs, nous avons suivi la marche du phénomène en faisant chaque jour des prises d'échantillons avec des pipetttes flambées et en dosant le nitrite ou le nitrate formé. Voici quelques expériences de cette nature.

1° *Fermentation nitreuse.* — 1,000 c. c. de milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Base carbonatée : carbonate de chaux. Ensemencement le 12/IX avec le ferment Java. Le tableau suivant indique la marche de l'oxydation.

DATES	RÉACTIONS		NITRITE formé en gr. de AzO^2Na par litre.	AUGMENTATION de nitrite par litre et par jour en gr. de AzO^2Na.
	Ne	Tr		
12/IX	+	o		»
15 »	+	f	traces	»
17 »	+	f	—	»
19 »	+	+	0,224	»
21 »	+	+	0.428	0,102
23 »	+	+	0.582	0,077
25 »	+	+	0.745	0,081
28 »	+	+	1.007	0,087
30 »	+	+	1,194	0,093
3/X	s	+	1.445	0,084
5 »	f	+	1.582	0,070
7 »	o	+	1,714	»

(*Ne*, réaction au Nessler ; *Tr*, réaction au Trommsdorff ; *o*, nulle ; *f*, faible ; *s*, sensible ; + intense.)

Nous voyons qu'il y a d'abord une période d'incubation de 6 jours pendant laquelle le ferment semble ne pas travailler. Puis apparaissent brusquement les nitrites, et l'oxydation se poursuit d'une façon à peu près régulière, sans augmenter ni diminuer d'intensité, jusqu'à la disparition complète de l'ammoniaque. Dans cette expérience, la vitesse de nitrification de l'ammoniaque est d'environ 90 milligrammes de nitrite formé par litre et par jour. La transformation de l'ammoniaque est si complète que le réactif de Nessler, pourtant très sensible, n'indique plus trace d'ammoniaque dans le liquide.

L'activité de l'oxydation de l'ammoniaque par notre ferment nitreux correspond à peu près à celle que signale M. Winogradsky dans son cinquième mémoire sur la nitrification[1], c'est-à-dire 20 milligrammes d'azote ammoniacal oxydé par jour.

2° *Fermentation nitrique.* — 1,000 c. c. de milieu minéral à 1 gramme par litre de nitrite de soude. Ensemencement le 5/9 avec le ferment Bruyère. On a pris chaque jour la réaction au Trommsdorff, puis la réaction à la diphénylamine après destruction des nitrites, et on a dosé le nitrate formé. Le tableau suivant résume la marche de l'oxydation :

DATES	RÉACTIONS		NITRATE formé en gr. de AzO^3Na par litre.	AUGMENTATION de nitrate par jour et par litre en gr. de AzO^3Na.
	Tr	Di		
5 IX	+	f	traces	»
7 »	+	+	0,200	»
9 »	+	+	0,334	0,067
11 »	+	+	0,466	0,066
14 »	+	+	0,734	0,090
16 »	f	+	1,085	0,175
17 »	o	+	1,157	»

Nous voyons qu'ici la période d'incubation est beaucoup plus courte. Le nitrate apparaît après 48 heures, l'oxydation est d'abord assez lente pendant les 5 ou 6 premiers jours, et la

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 609.

quantité de nitrate formé est d'environ 70 milligrammes d'azotate de soude par litre et par jour. Mais bientôt le phénomène s'accélère : dans les 3 jours suivants, il s'est formé en moyenne 90 milligrammes d'azotate de soude par litre et par jour, et, dans les derniers jours, 175 milligrammes, soit presque une quantité triple de celle qui se formait au début. Comme pour le ferment nitreux, l'oxydation est ici absolument complète, et, au bout de 12 jours, le réactif iod-amylique, pourtant très sensible, ne décelait plus trace de nitrite.

La vitesse de l'oxydation est ici très supérieure à celle qui a été observée par M. Winogradsky pour le ferment nitrique[1]. Ce savant n'a obtenu, avec un ferment d'une énergie exceptionnelle et au bout de 6 semaines de culture, que 10 milligrammes d'azote nitreux oxydé par jour. Nous voyons qu'en 12 jours, y compris la période d'incubation, notre ferment nitrique a oxydé environ 200 milligrammes d'azote nitreux, soit en moyenne 17 milligrammes par jour, et que cette quantité a atteint à un moment donné 30 milligrammes.

Ce ferment paraît donc beaucoup plus actif que celui de M. Winogradsky, et sa puissance est certainement supérieure à celle de notre ferment nitreux. Nous en trouverons d'autres preuves bientôt.

3° *Fermentations des deux microbes nitrificateurs en symbiose.* — Il semble difficile à première vue de réaliser au laboratoire la culture symbiotique véritable des deux organismes, c'est-à-dire la transformation *simultanée* du sel ammoniacal en nitrite par le ferment nitreux et du nitrite en nitrate par le ferment nitrique. En effet, la plupart des expérimentateurs qui se sont occupés de la nitrification ont constaté que l'ammoniaque passe d'abord à l'état de nitrite, et que l'oxydation du nitrite ne commence que quand la phase nitreuse est terminée. Il y a donc action successive des deux microbes et non pas symbiose.

M. Winogradsky avait donné, en 1891, une première explication de ce fait. D'après ce savant, le ferment nitreux, beaucoup plus actif que le ferment nitrique, étouffe au début la végétation de ce dernier microbe, qui ne peut se multiplier que quand la fermentation nitreuse est terminée.

Dans le milieu terre, la symbiose qu'on observe toujours

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 610.

était due, d'après M. Winogradsky, à la porosité du milieu [1].

Au contraire, M. Warington [2] expliquait le phénomène par une action paralysante de l'ammoniaque sur le ferment nitrique.

Les résultats que nous avons signalés plus haut au sujet de l'activité des deux ferments font considérer la première hypothèse comme très peu probable. D'ailleurs, MM. Winogradsky et Oméliansky ont reconnu depuis que l'hypothèse de M. Warington est parfaitement exacte et ils ont démontré d'une façon précise que l'ammoniaque exerce sur le ferment nitrique une action déprimante très énergique [3]. La dose de 5 milligrammes d'ammoniaque par litre sous forme de sulfate d'ammoniaque retarde nettement la marche du ferment, la dose de 150 milligrammes par litre l'arrête complètement.

MM. Winogradsky et Oméliansky se sont basés sur cette sensibilité du ferment nitrique à l'ammoniaque pour expliquer les phénomènes qui se passent dans la nitrification dans la nature. D'après ces auteurs, les germes du ferment nitrique, paralysés par les plus petites traces d'ammoniaque, restent à l'état de repos jusqu'à disparition complète de ce corps, et leur action ne commence à se manifester, après incubation plus ou moins longue, que lorsque la fermentation nitreuse est complètement terminée.

Cette manière de voir est parfaitement conforme aux faits quand on examine les expériences de symbiose entreprises au laboratoire. Nous allons voir en effet que, dans la plupart des cas, la fermentation nitreuse s'établit d'abord et la fermentation nitrique n'apparait que quand la première est à peu près terminée. Mais dans la pratique, cette opinion est directement contredite par les faits. On voit couramment la symbiose se produire dans les lits bactériens d'épuration des eaux résiduaires, en présence de doses d'ammoniaque parfois très élevées. Il se forme simultanément de faibles quantités de nitrites et de fortes quantités de nitrates et les eaux après épuration contiennent encore de l'ammoniaque non oxydée. Les deux phénomènes sont donc superposés et non pas successifs. Citons comme exemple la nitrification des eaux des abattoirs de Lille, contenant jusqu'à 210 milligrammes d'ammoniaque libre ou saline par litre, qui s'est

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 612.
2. *Proceedings of the chem. Soc.*, n° 98, 1891.
3. *Archives des Sciences Biologiques de Saint-Pétersbourg*, t. VII, p. 233.

effectuée sans difficultés, la majeure partie de l'ammoniaque passant à l'état de nitrates avec une formation intermédiaire de nitrites presque insensible[1]. Cette dose d'ammoniaque est supérieure à celle qui arrête complètement la marche du ferment nitrique. On sait en outre, par les expériences de M. Schlœsing[2], que des doses considérables d'ammoniaque n'empêchent nullement l'action du ferment nitrique dans la terre. Ces faits nous conduisent à penser qu'il doit exister un mécanisme qui permet dans certaines conditions la marche symbiotique des deux organismes.

Dans le but d'élucider cette question, nous avons fait plusieurs essais de culture des deux microbes nitrificateurs associés. Nous en rapporterons ici deux seulement.

Première expérience. — 1,000 c. c. de milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Base carbonatée : carbonate de chaux. Ensemencement simultané du ferment nitreux Java et du ferment nitrique Bruyère le 12/9. On a fait chaque jour une prise d'échantillon, noté les réactions au Nessler, au Trommsdorff et à la diphénylamine (après destruction des nitrites), et on a dosé le nitrite et le nitrate produits. Le tableau suivant résume la marche de la fermentation :

DATES	RÉACTIONS			NITRITE formé en gr. de AzO^2Na par litre.	NITRATE formé en gr. de AzO^3Na par litre.
	Ne	Tr	Di		
12/IX	+	f	f	»	»
18 »	+	+	f	0,175	0,135
21 »	+	+	f	0,341	0.136
28 »	+	+	f	0,820	0,139
30 »	+	+	f	0,945	0.137
5/X	+	+	f	1,306	0.222
8 »	+	+	f	1,512	0,217
10 »	o	+	+	1,304	0,621
12 »	»	+	+	»	1,345
14 »	»	o	+	0	2,211

1. Dr A. Calmette, Les Procédés Biologiques d'épuration des eaux résiduaires. *Revue d'Hygiène*, tome XXIII, mars 1901.
2. *C. R. de l'Académie des Sciences*, t. CIX.

Les conclusions à tirer sont nettes : il n'y a pas eu symbiose, mais action successive des deux organismes. Le ferment nitreux a d'abord transformé tout le sulfate d'ammoniaque en nitrite, et ce n'est que quand cette transformation a été complète que le nitrique a attaqué le nitrite. Il semble bien y avoir eu une tentative de multiplication du ferment nitrique vers le 5/10, un peu avant la fin de la fermentation nitreuse, mais l'augmentation en nitrates est restée faible tant que le réactif de Nessler a indiqué de l'ammoniaque. Remarquons aussi la puissance extraordinaire d'oxydation de notre ferment nitrique dans cette expérience : en six jours, tout le nitrite est passé à l'état de nitrate, soit en moyenne 50 milligrammes d'azote nitreux oxydé par jour.

Deuxième expérience. — Nous avons alors voulu nous rendre compte si, en cultivant les deux ferments dans un grand ballon en présence de scories, on ne peut pas favoriser la symbiose. On imite ainsi ce qui se passe dans la pratique de l'épuration des eaux résiduaires par les procédés biologiques. 1,200 c. c. de liquide minéral à 1^{gr},8 de sulfate d'ammoniaque par litre ont été placés dans un grand ballon à fond plat, contenant des scories jusqu'à 2 centimètres au-dessus du niveau du liquide. Ensemencement simultané des deux ferments le 12/9. Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

DATES	RÉACTIONS			NITRITE produit en gr. de AzO^2Na par litre.	NITRATE produit en gr. de Azo^3Na par litre.
	Ne	Tr	Di		
12/IX	+	f	f	»	»
17 »	+	+	f	0,222	0,125
19 »	+	+	f	»	0,127
21 »	+	+	f	1,064	0,123
22 »	+	+	f	»	0,171
23 »	f	+	+	1,298	0,230
24 »	o	+	+	»	0,428
25 »	»	+	+	»	0,779
26 »	»	+	+	»	1,343
27 »	»	f	+	»	1,802
28 »	»	o	+	0	1,884

Nous voyons ici que la symbiose s'est effectuée pendant un temps très court, quand le taux d'ammoniaque est devenu faible. Mais l'augmentation de nitrates n'a été rapide qu'à la fin de la fermentation nitreuse. Le résultat est en somme à peu près identique à celui de l'expérience précédente : fermentation nitreuse d'abord, puis fermentation nitrique intense qui a amené en 5 jours tout le nitrite à l'état de nitrate.

La marche du phénomène a encore été identique avec un ensemencement très copieux : 100 c. c. de fermentation nitreuse et de 100 c. c. de fermentation nitrique pour un litre de liquide. Les deux fermentations ont toujours été sucessives.

Symbiose des deux organismes. — Dans ses premières études sur les microbes nitrificateurs, M. Winogradsky[1], en recherchant les causes de la formation des nitrites dans les cultures en voie de nitrification, signale une observation qui, rapprochée de ce que nous savons aujourd'hui sur l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique, revêt un caractère particulièrement intéressant. Sur une nitrification qui a donné successivement des nitrites et des nitrates, M. Winogradsky rajoute une très faible quantité de sulfate d'ammoniaque (4 milligrammes) et renouvelle cette addition chaque fois que les nitrites ont disparu. Dans ces conditions on observe le passage direct de l'ammoniaque à l'état de nitrates, comme dans le phénomène naturel. En rajoutant des doses plus fortes de sulfate d'ammoniaque, les nitrites réapparaissent. Il était difficile alors de préciser cette observation et d'en donner une explication plausible. La seule conclusion à tirer était que la production des nitrites ou des nitrates dans la nitrification dépend non pas des qualités physiques ou chimiques du milieu, mais est d'ordre biologique.

Les notions acquises depuis sur l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique rendent l'observation de M. Winogradsky encore plus singulière. Nous avons donc dirigé nos recherches dans cette voie, qui nous paraissait susceptible de nous donner une explication précise des phénomènes de symbiose.

Dans le matras à scories de notre deuxième expérience, qui vient de terminer sa nitrification par le mécanisme que nous avons indiqué, enlevons aseptiquement le liquide, et rajoutons maintenant un litre de nouveau milieu minéral à $1^{gr},8$ environ

1. *Annales de l'Institut Pasteur,* 1891, p. 587.

de sulfate d'ammoniaque par litre. Ces opérations se font aisément dans ces grands matras munis de tubulures latérales. Faisons de temps à autre des prises d'échantillons pour nous rendre compte de la marche du phénomène.

Les résultats obtenus vont être tout à fait différents. Nous allons voir apparaître la symbiose parfaite des deux organismes, symbiose qui va se continuer désormais de la façon la plus régulière. Voici en effet les résultats des dosages effectués à intervalles de 24 heures en moyenne :

DATES	RÉACTIONS			NITRITE formé en gr. de AzO^2Na par litre.	NITRATE formé en gr. de AzO^3Na par litre.
	Ne	Tr	Di		
7 X	+	o	+	0	0,537
10 »	+	f	+	traces	»
12 »	+	s	+	0,148	0,823
13 »	+	s	+	0,146	0,951
15 »	+	s	+	0,191	1,186
16 »	+	f	+	traces	1,426
17 »	+	o	+	0	1,732
19 »	s	o	+	0	2,236
20 »	o	o	+	0	2,324

Réactions : *o*, nulle; *f*, faible ; *s*, sensible ; +, forte.

Ce tableau nous montre que le taux des nitrites a toujours été très faible dans le liquide, et que les nitrates ont augmenté progressivement depuis le début jusqu'à la disparition complète de l'ammoniaque. Malgré la dose de 460 milligrammes d'ammoniaque par litre, les deux fermentations ont été simultanées et non successives, et il y a eu véritable symbiose des deux organismes dans un milieu riche en ammoniaque.

Cette expérience a été renouvelée d'une autre manière. Nous avons effectué d'abord une première nitrification qui a donné lieu aux deux fermentations successives; puis, sans retirer le liquide nitrifié, nous avons ajouté une nouvelle dose de 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, sous forme d'une solution stérile. La symbiose s'est produite aussitôt et s'est

poursuivie jusqu'à disparition complète de l'ammoniaque. Nous avons alors ajouté une troisième dose de 2 grammes de sulfate d'ammoniaque par litre, qui a nitrifié dans les mêmes conditions; puis une quatrième dose pour laquelle la nitrification symbiotique s'est encore produite. Nous n'avons pas cru utile de pousser l'expérience plus loin, car elle pouvait se compliquer d'influences qui n'ont rien de commun avec le problème.

Nous avons enfin réalisé la même expérience sur une nitrification en milieu liquide, sans présence de scories. Les résultats ont été identiques : la première nitrification a donné lieu aux deux fermentations successives, la seconde à la symbiose.

Lorsqu'on place les deux microbes dans des conditions de culture exceptionnellement favorables, on peut même arriver à produire du premier coup la symbiose dans le milieu minéral à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque. Il suffit pour cela d'employer la méthode que nous avons indiquée dans notre premier mémoire, c'est-à-dire d'ensemencer très copieusement (100 c. c. pour 1 litre), les deux ferments dans de petits tonneaux roulants en verre remplis de scories, stérilisés et parcourus par un courant d'air stérile. La nitrification s'effectue alors complètement en symbiose avec une formation intermédiaire de nitrites presque insensible.

Les résultats sont encore plus nets avec la culture pure des deux organismes dans un long tube de verre vertical, de 6 centimètres de diamètre, composé de trois morceaux de 80 centimètres superposés, stérilisables séparément et remplis de scories. Cet appareil correspond en somme parfaitement à l'appareil vertical allemand pour la fabrication du vinaigre. Il recevait à la partie supérieure goutte à goutte la solution minérale à 2 grammes par litre de sulfate d'ammoniaque, fortement ensemencée par les deux ferments : le liquide recueilli à la partie inférieure était remonté, par une petite pompe à air stérilisé, dans le réservoir du haut. Tout l'appareil, dans lequel les microbes nitrificateurs étaient maintenus à l'état pur, était parcouru par un très lent courant d'air filtré sur coton, et chaque tube portait une tubulure de prise d'échantillon. Dans ce « nitrificateur vertical », le phénomène a été d'une intensité extrême. Les trois tubes ont donné indistinctement du premier coup peu ou pas de nitrites et beaucoup de nitrates, jusqu'à disparition

de l'ammoniaque. La symbiose était donc complète partout.

Mais ce sont là des conditions exceptionnelles, et dans les procédés de culture ordinaires du laboratoire, le phénomène se passe toujours comme nous l'avons indiqué plus haut : les deux fermentations sont d'abord successives, et ne deviennent simultanées qu'après une première nitrification qui a permis le développement des deux organismes.

Ces diverses observations nous conduisent à la nécessité d'une étude plus précise de l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique. Les résultats qui précèdent semblent indiquer que si l'ammoniaque agit très énergiquement sur le ferment nitrique « végétal » et gêne beaucoup sa multiplication, elle paraît très peu active sur la fonction oxydante du microbe développé. Ainsi s'expliqueraient les résultats opposés de la nitrification au laboratoire et dans la nature. Au laboratoire, on ensemence le microbe, généralement en petite quantité, dans le milieu ammoniacal, et la multiplication du ferment nitrique se fait mal : d'où pas de symbiose. Dans la nature, au contraire, nous sommes ordinairement en présence de supports peuplés, comme le sol et les lits bactériens d'épuration, supports en voie de nitrification continue : c'est le cas de notre dernière expérience, dans lequel la symbiose est la règle.

Action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique. — Pour fortifier l'hypothèse qui précède, nous pouvons dès maintenant donner les premiers résultats de nos expériences actuellement en cours sur l'action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique.

Cette action a été mise pour la première fois nettement en évidence par MM. Winogradsky et Oméliansky[1]. Mais ces savants se sont bornés au simple examen de la réaction nitritée, qui ne peut indiquer si la nitrification a été nulle ou partielle. Nous avons donc d'abord répété leur expérience en ensemençant le ferment nitrique dans le milieu minéral à 1 gramme par litre de nitrite de soude, en présence de doses croissantes de sulfate d'ammoniaque, et au bout de deux mois environ, nous avons dosé le nitrite restant dans les matras qui n'avaient pas terminé leur nitrification. L'ensemencement a été assez fort, 1 c. c. de culture jeune pour 25 c. c. de milieu. Voici les résultats obtenus :

1. *Archives des Sciences biologiques de Saint-Pétersbourg*, tome VII, p. 233.

Action sur le ferment de l'ammoniaque ajoutée avant l'ensemencement.

AMMONIAQUE en gr. p. litre de liquide.	RÉACTIONS AU Tr. Dates.													DURÉE de la nitrification.	NITRITE initial en gr. de AzO^2Na p. litre.	NITRITE restant en gr. de AzO^2Na p. litre.
	Ensst 20/10	27	28	29	30	4/11	5	6	14	16	2/12	6	12			
0 témoin	+	s	o											8 jours	1,081	0
0,00515	+	+	+	s	o									10 —	—	0
0,0103	+	+	+	+	+	s	o							16 —	—	0
0,0206	+	+	+	+	+	+	s	o						17 —	—	0
0,0412	+	+	+	+	+	+	+	s	f	o				27 —	—	0
0,0824	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s	f	o	53 —	—	0
0,1236	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	incomplète	—	0,507
0,1648	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,830
0,2575	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,891
0,4120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,914
0,721	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,952
1,034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,951
1,500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	0,937
2,040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	»

Nous arrivons donc ici aux mêmes conclusions que MM. Winogradsky et Oméliansky. Depuis la dose de 5 milligrammes d'ammoniaque par litre, les durées de nitrification s'allongent de plus en plus, et, pour 82 milligr. le retard sur le témoin atteint 45 jours. Pour les doses supérieures, le réactif de Trommsdorff indiquait encore après 2 mois la présence de fortes quantités de nitrites. Si nous examinons les résultats des dosages, nous constatons que le ferment nitrique a agi partout. A la dose de 164 milligr., dose limite indiquée par MM. Winogradsky et Oméliansky, il n'y a plus qu'un cinquième environ qui a nitrifié. Aux doses d'ammoniaque supérieures, la diminution de nitrites est faible et à peu près la même partout. Il semble donc y avoir une dose, voisine de 160 à 180 milligrammes d'ammoniaque par litre, au delà de laquelle on

13

n'observe qu'une légère transformation due aux microbes jeunes introduits par la semence.

Plaçons-nous maintenant dans le cas de notre symbiose. Faisons d'abord nitrifier le ferment nitrique sur une dose de 2 grammes par litre de nitrite; puis, quand la nitrification est terminée, rajoutons une nouvelle dose de nitrite et en même temps des doses croissantes de sulfate d'ammoniaque sous forme de solutions stériles. Voici ce que nous observerons :

Action de l'ammoniaque sur le ferment nitrique en voie de nitrification. — Addition du nitrite le 26 novembre.

AMMONIAQUE en gr. par litre de liquide.	RÉACTIONS AU Tr. Dates. 26/11	27	28	29	30	1/12	5	12	NITRITE ajouté en gr. de AzO^2Na par litre.	NITRITE restant en gr. de AzO^2Na p. litre.
0 témoin	+	+	s	o					1,080	0
0 —	+	+	s	o					—	0
0 —	+	+	+	s	o				—	0
0,0046	+	+	s	o					—	0
0,0092	+	+	s	o					—	0
0,0184	+	+	s	f	o				—	0
0,0368	+	+	s	f	o				—	0
0,0736	+	+	s	f	o				—	0
0,1104	+	+	s	f	o				—	0
0,1472	+	+	+	s	f	f	f	f	—	traces
0,2298	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
0,3680	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
0,6437	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
0,9200	+	+	+	+	s	f	f	f	—	—
1,3794	+	+	+	+	+	s	s	s	—	0,150
1,8400	+	+	+	+	+	s	s	s	—	0,180

Réactions : *o*, nulle ; *f*, faible : *s*, sensible; +, intense.

Quand on ajoute du sulfate d'ammoniaque sur un ferment nitrique en voie de nitrification, on observe donc les phénomènes suivants :

1° Il n'y a pas de retard dans la nitrification jusqu'aux doses de 110 milligrammes d'ammoniaque par litre;

2° Jusqu'aux doses de 2 grammes par litre, le retard est peu accusé et atteint à peine 48 heures, mais l'oxydation du nitrite n'est pas absolument intégrale, et il reste au Trommsdorff une petite réaction bleutée qui ne disparaît que très lentement. Les quantités de nitrite restant ne sont pourtant dosables que pour les proportions de 1gr,37 à 1gr,84 d'ammoniaque par litre, où elles atteignent environ 150 à 180 milligrammes de nitrite par litre, sur 1,080 introduits.

Ces résultats concordent parfaitement avec ceux que nous avons obtenus dans la culture des deux organismes en symbiose et donnent l'explication du phénomène. L'ammoniaque agit sur le ferment nitrique surtout en gênant sa multiplication, et il faut atteindre des doses très fortes d'ammoniaque pour retarder légèrement la fonction oxydante du microbe.

Cherchons maintenant à appliquer ces notions à la nitrification dans la nature. Les milieux qui nitrifient contiennent en général une quantité d'ammoniaque inférieure à la dose qui arrête tout développement du ferment nitrique. Cette dose, qui est de 200 milligrammes par litre environ, n'est atteinte et dépassée que dans quelques eaux résiduaires très impures, comme les eaux d'abattoirs. Dans les terres, qui sont en voie de nitrification incessante, il y a généralement peu d'ammoniaque. Le ferment nitrique se multiplie donc dès le début, plus ou moins vite suivant la quantité d'ammoniaque présente. Ces notions sont bien d'accord avec les observations des auteurs qui se sont occupés de l'épuration des eaux résiduaires, et qui ont constaté que dans la mise en marche des lits bactériens, la proportion de nitrites est en général plus grande au début que par la suite. Quand le support est peuplé, c'est-à-dire quand les deux microbes sont développés, la symbiose s'effectue alors d'une façon absolue. Si même les conditions viennent à changer et si le taux d'ammoniaque s'élève, nous avons vu que le ferment nitrique qui s'est développé en oxydant une dose donnée de nitrite est toujours capable de transformer en présence d'ammoniaque une dose de nitrite *au moins égale* à la première. La symbiose ne cessera donc pas de s'exercer; le ferment nitreux abaisse de plus en plus le taux d'ammoniaque et bientôt la

multiplication du ferment nitrique recommence. Comme la dose de 200 milligrammes d'ammoniaque par litre, qui arrête toute multiplication du ferment nitrique, n'est que très rarement dépassée dans la pratique, on comprend sans peine que les phénomènes de nitrification ne se présentent à nous dans la nature que sous la forme symbiotique qui résulte de l'action simultanée des deux organismes.

Ceci ne veut pas dire que la question soit complètement tranchée, et il reste maintenant à étudier le mécanisme même de l'action du ferment nitrique sur le nitrite en présence de fortes doses d'ammoniaque, car ce mécanisme seul permettra de tirer tout à fait au clair la question de la vie symbiotique des deux microbes. Cette étude est aujourd'hui assez avancée, et nous espérons pouvoir l'aborder prochainement ici.

ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

(*Suite*. Voir p. 121.)

Par M. E. Duclaux

X

TERRAINS PRIMITIFS

Des terrains de gneiss, laissés en blanc sur la carte, (v. p. 122) une partie nous apparaît telle qu'elle était lorsqu'elle formait les rivages de la mer calcaire miocène que nous avons décrite. C'est surtout au sud d'Aurillac, où ils dominent encore la vallée de la Cère. Ils ont vu le lac se dessécher, le volcan naître et mourir, se creuser les 3 vallées de la Cère, de la Jordanne et de l'Authre, sous l'influence des pluies et des glaciers, et celui de nos aïeux qui habitait les plateaux de Prunet, de la Roumiguière, de Labrousse, a pu voir de curieux spectacles.

Les pentes du volcan étaient à peine consolidées que leur érosion commençait. Les premières portions enlevées étaient celles de la surface, et nous avons vu les îlots volcaniques qui sont les derniers témoins de l'effrangement et de la dislocation des couches de basalte et de phonolite étalés sur les couches calcaires.

Plus loin, à partir du centre, nons voyons de même des îlots de calcaire, en général éocènes, qui apparaissent sur le terrain primitif, réserves, pour l'érosion de demain, de celle d'aujourd'hui. Puis vient le terrain primitif, sur lequel tout revêtement calcaire a disparu, et où, les étages de calcaire et de terrain volcanique ayant été arrasés, il n'y a plus que l'étage du rez-de-chaussée avec celui des caves.

Dans l'étude de ce terrain, je n'ai pas fait de distinction entre les gneiss, les micaschistes, les granulites ou les granites, car, à notre point de vue, tous sont identiques. J'ai aussi négligé, parce qu'elle est sans importance, la mince bande de terrain houiller qui traverse le Cantal, et qui est surtout visible près du confluent de la Cère et de l'Authre.

Dans ce sol, qui s'abaissait peu à peu, les rivières s'occupaient à creuser leur lit, et elles y avaient de la peine.

Tant qu'elles coulent dans le terrain volcanique, ce sont des torrents. Le fond de leur lit est occupé par des débris, parfois très volumineux, provenant de l'éboulement des hauteurs. Le travail des eaux, bien moins puissant qu'autrefois, s'emploie aujourd'hui à dégrader ces débris et à en faire du sable, à user, par suite, le fond du lit.

Quand cette érosion, qui creuse le fond, est venue rencontrer les couches calcaires, celle de la Cère à Vic, de la Jordanne à Velzig, de l'Authre à Marmanhac ou à La Roquevieille, la vallée s'élargit. Le fond devient moins dur, plus facile à dissoudre et à briser. Le cours se régularise. C'est la rivière tranquille, glaciaire, qui dure sur toute la traversée du terrain tertiaire. jusqu'à ce qu'elle ait rencontré des gneiss et des granulites en masse ou en filons. C'est là que se dresse devant elle l'obstacle dont elle doit triompher pour sortir de ce fond de cuvette dont j'ai parlé en débutant, et pour quitter le département.

De Sansac pour la Cère et la Jordanne, d'Ytrac pour la rivière d'Authre, on voit bien, même sur la carte routière, que le sol a changé. La vallée s'est resserrée. La vallée n'est plus qu'un ravin. C'est le régime du début qui recommence, et quand les trois rivières se sont réunies à La Capelle-Viescamp, la Cère n'a plus qu'un cours tourmenté, que le chemin de fer côtoie, jusqu'au moment où elle rencontre la grande vallée, où elle oublie ses origines volcaniques.

On retrouverait des faits analogues pour les autres rivières du Cantal. en faisant attention que, pour elles, les deux premières parties du cours se confondent presque en une, la rivière passant directement du terrain volcanique sur le terrain primaire.

La Bertrande n'a qu'un seul point de transition, visible par le faible lambeau de calcaire qu'on trouve au sud, et près de Saint-Chamand. La Maronne a un palier calcaire en face de Salers, et l'Auze s'élargit en face de Salins à peu près comme la Cère au Pas-de-Cère. Il y a donc, sous les différences apparentes, une ressemblance profonde dans le régime de toutes ces eaux.

A toutes ces ressemblances générales, nous savons maintenant ajouter une différence qui est de détail, mais qui n'a pas moins une grande importance. C'est que le micaschiste du Cantal est en moyenne plus absorbant que le terrain volcanique, et

même que le terrain tertiaire. Le gneiss absorbe d'ordinaire tout ce qui lui arrive d'eau de pluie, soit par sa porosité naturelle, soit que le manteau de végétation, que cette porosité favorise en maintenant de l'humidité dans les couches superficielles, produise l'effet de tous les couverts. Il y a peu ou pas de ruissellement: le sol est moutonné, et, dans les vallées ou ravins, les pentes ne s'éboulent pas, c'est pour cela que le fond du ravin qui est toujours nu se creuse toujours. On retrouve partout la même tendance, et la Truyère coule dans un ravin qui se creuse comme les gorges de la Cère.

Tout ce que nous venons de voir nous renseigne sur l'hydrographie souterraine de la région. Il est clair qu'on ne peut s'attendre ici à aucun grand mouvement des eaux, et que le régime sera celui des petites sources ou des puits, comme dans la partie calcaire. Seulement, la ressemblance des mots cache une profonde différence des choses.

Ici, le sol n'est pas formé de couches superposées, inégalement perméables ou même tout à fait imperméables. En principe, il reste perméable, et il s'y forme à chaque pluie un approvisionnement d'eaux qui pénètre plus ou moins profondément, et se met à couler de suite sur les lignes de plus grande pente, ou plutôt sur les lignes de plus facile pénétration, qui se modèlent plus ou moins sur les premières. C'est une éponge qui s'égoutte,

La comparaison avec une éponge s'impose d'autant plus que les grandes masses de micaschiste et de gneiss sont parcourues dans tous les sens par des lignes de feuilletage, qui les divisent en fragments très inégalement perméables et pénétrables par l'eau.

Les grandes masses aqueuses qu'elles conservent et limitent sont presque sans relation entre elles : il n'y a pas de niveau piézométrique, au sens défectueux qu'on donne aujourd'hui à cette expression. Bien qu'il y ait partout de l'eau, la pression est différente quand la distance de la surface est la même.

Il résulte de cette pénétration inégale de l'eau par tous les points de la surface deux choses : 1° on trouvera de l'eau en creusant où l'on voudra, et cette eau, qui n'aura pas cessé de faire partie de la masse, aura pourtant son niveau et sa pente particulière, le long de laquelle elle coulera régulièrement : voilà pour les puits, 2° il suffira d'une petite dénivellation, ou de la

moindre tranchée, pour faire naître une petite source qui aura aussi naturellement ses voies d'évacuation. 3° Les puits comme les sources ne voudront rien connaître des prétendues lois piézométriques.

XI

EAUX DU TERRAIN PRIMITIF

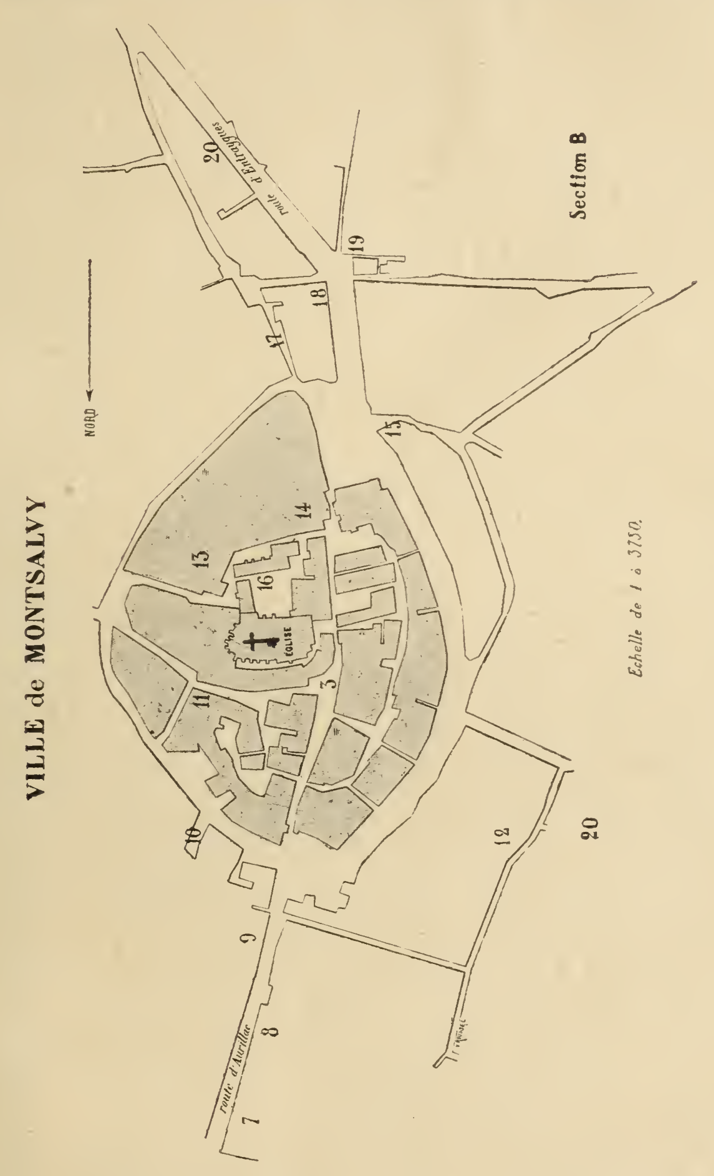
La réalité est tout à fait d'accord avec ces prémisses. Les puits sont presque aussi nombreux qu'on le veut. A toutes les altitudes, au sommet d'une colline comme sur les pentes d'un vallon, il suffit de creuser le sol à quelques mètres pour trouver, plus ou moins haut, un niveau d'eau qui, parfois est indépendant, et parfois se forme à l'aide des puits voisins. Comme on a d'ordinaire choisi un sol de schiste pourri, qui est fendu et se délite, on se met à l'aise pour creuser. Il n'est pas rare de voir des puits de 2 mètres de large. Comme ces puits sont d'ordinaire communs, on ne les respecte pas et ils sont exposés à toutes les pollutions. Si les habitations ainsi desservies ne sont pas voisines, le mal n'est pas encore trop grand. Il faut seulement éviter le voisinage immédiat des fosses d'aisances ou des fumiers. Mais si les maisons sont condensées en village, le mal grossit en se répercutant. Je n'en sais pas de meilleur exemple que celui que j'ai trouvé dans la petite ville de Montsalvy (Cantal).

C'est un gros bourg de commerce et de transit, assis sur un petit mamelon porté par un contrefort qui court du Nord au Sud, en s'abaissant vers les vallées de la Truyère et du Lot.

Quand il s'est agi de trouver de l'eau pour ce village qui grossissait, on a imité ce qui avait été fait pour les premières maisons bâties. On a fait des puits à l'extérieur de la maison, dans le jardin; on en a fait dans des caves quand les maisons se serraient et qu'il n'y avait pas de place ailleurs, parce que cela diminuait les frais, de sorte que les habitants avaient tranquillement pris l'habitude d'envoyer leurs déjections et leurs eaux-vannes dans le même sous-sol qui leur donnait de l'eau de boisson.

A ce défaut de propreté intérieure venait s'ajouter un défaut de propreté extérieure. Quand le temps est mauvais, le sol, poreux, s'humecte à fond et devient boueux et visqueux. Pour rendre la circulation plus facile, on répand sur le sol des lits de

bruyère et de fougère, que le piétinement décompose sur place, et qui, dans toutes les rues (les routes sont protégées par les



règlements), forment une couche de fumier absorbant, de sorte que la ville semble avoir pris à tâche de conserver et de laisser

à portée de ses habitants tout ce dont ceux-ci ont intérêt à se débarrasser.

Les plaintes provoquées par un pareil état des choses doivent dater de longtemps, car la ville s'est donné de l'eau prise au puy de l'Arbre, à une distance d'environ 1.000 mètres. Ce puy, dont l'altitude est de 814 mètres, domine tout le pays à plusieurs kilomètres à la ronde. Sur un autre terrain, on n' aurait guère trouvé d'eau, car le puy n'est pas étendu, mais avec le gneiss, comme j'ai dit plus haut, il y a toujours de la ressource. Une petite source, la fontaine d'Argent, réunie au produit de plusieurs drainages, fournit, au moyen d'un travail, terminé seulement en 1894, un volume d'eau qui s'élève à 40 m. c. par jour pendant les mois d'hiver, mais qui retombe à 2 ou 3 m. c. en été.

Le puy de l'Arbre est stérile et désert, heureusement, car, grâce à cela, on peut dire qu'un peu d'eau vierge entre journellement en ville, mais la population ne semble pas en avoir pris encore l'habitude, et la fontaine publique n'est guère fréquentée.

Ce sont les puits qui fournissent à l'usage; le puits de l'Arque, en particulier qui ne tarit point et qui semble être un égouttage du puy de l'Arbre. Lorsque j'ai visité Montsalvy, c'était au moment d'une petite épidémie de fièvre typhoïde, qu'on accusait ce puits d'avoir amenée. Cela est possible.

Le jardin, dans le mur duquel est creusé le puits, contient, à une distance de quelques mètres, un tas de fumier sur lequel est établie une fosse d'aisance rudimentaire, qui n'est heureusement pas publique, mais l'eau du puits est à la portée de tous.

Il est donc possible que la contagion se soit faite par ce point : mais je dois dire qu'en visitant la ville, j'ai trouvé, sur une surface d'environ 2 hectares, 22 puits dont chacun pouvait être accusé au même titre que tous les autres. (Voir la carte.)

J'ai donc jugé utile de faire à ce moment un relevé de situation, en comparant la composition de l'eau des puits de Montsalvy à ceux des régions avoisinantes.

Je suis allé 2 fois, à 15 jours d'intervalle, en octobre 1897, prélever les eaux sur tout mon parcours, en insistant, bien entendu, de préférence sur celles de la petite ville, que j'ai recueillies à leur entrée, dans les puits, dans les maisons et jardins, et en suivant aussi bien que j'ai pu le faire le trajet de

la nappe des puits à la sortie de la ville, au moment où elle enfile le ravin encaissé qui la conduit à la Truyère, du côté de la route d'Entraygues. Je suis ensuite allé visiter quelques localités des environs, dans le même horizon géologique.

L'été de 1897 avait été très pluvieux.

Là où il y a eu 2 échantillons prélevés, le premier l'a été après 8 jours de beau temps, le second après une période de 15 ou 20 jours de pluies. Il y a au moins, par provenance, une analyse complète, je veux dire réduite aux mêmes termes que dans tout ce travail, dont les éléments sont ici tous utiles. Voici les chiffres des analyses.

Le n° I est celui de la première tournée, fin septembre 1897 ; le n° II celui de la seconde, le 20 octobre de la même année.

EAUX DE MONTSALVY

Nos d'ordre	Origine	Tempre	Residu	Chaux	Sel marin
268	Source sur la route	10,4	26	1	5,0
269	Fontaine d'argent	10.6	35	2,0	5,0
270	Source Viguier	11,2	36	1,5	6,0
271	Pré Bastid	?	35	1,5	5,8
272	Source Picou	?	42	4,0	10,0
273	Fontaine publiq. I.	?	35	2,5	6,6
274	— II.	9,8	22	1,5	8,3
275	Puits de M. D. I.	10.6	563	54	221
276	— II.	10,5	575	31	205
277	Puits de M. M. I.	11.6	188	33	25
278	— II.	?	233	»	»
279	Puits de M. V. M.	10,5	323	35	97
280	Puits du Couvent I.	12,0	256	38	39
281	— II.	?	267	30	45
282	Puits public I.	12,6	534	30	179
283	— II.	?	601	28	195
284	Puits du Cloître I.	10,6	423	107	80
285	— II.	?	425	»	»
286	Puits de M. Fl. I.	10,6	676	74	213
287	— II.	10,4	690	59	220
288	Puits de M. C.	11.0	449	40	176
289	Font. del'Arque 10 I.	11,2	348	28	91
290	— II.	?	364	28	90
291	Puits de M. M. I.	9.8	135	17	40
292	— II.	9,3	137	14	36

293	Puits de M. C.	I.	9,8	218	29	72
294	—	II.	8,3	222	»	»
295	Puits de M. R.	I.	9,8	335	48	83
296	—	II.	9,8	328	»	»
297	Puits de M. R.-B.	I.	12,3	308	20	108,0
298	—	II.	10,8	301	»	»
299	Puits des Frères.		9,2	105	14	21,0

Observations. — 268 à 270, sources du Puy-de-l'Arbre. — 271 et 272, source en entrant à Montsalvy. — 273 et 274, eaux de la ville. — 275 et 276, puits fermé, mais alimentant une pompe dans la cuisine. — 277 et 278, eau un peu blanchâtre : prof. 5 mètres. — 279, prof. 2^m,60, de l'autre côté de la route. — 280 et 281, pompe placée dans la cuisine. — 282 et 283, ancien puits privé, rendu public par M. D..., filaments gélatineux : eau à 1^m,50. — 284 et 285, puits ouverts : prof. 5^m.50. Matières flottantes et abondantes que je filtre. — 286 et 287, eau laiteuse : prof. 4^m.50. — 288. près l'école : quelques flocons en suspension. — 289 et 290, au fond d'une niche creusée dans le mur d'un jardin. Dans ce jardin, à 10 mètres environ du puits, un fumier avec latrines. Autour du puits, étables ou écuries avec purin ; en ce moment, l'épidémie a fait abandonner le puits. — 291 et 292, eau louche ; puits couvert : prof. 9^m,40. — 293 et 294, eau un peu louche ; — 295 et 296, voisins du 289 et 296, sur l'autre versant du précédent : à 20 mètres environ de la fosse d'aisances. — 297 à 299, ces 2 puits sont dans 2 jardins voisins. Le premier à 0^m,80 au-dessous du sol, le second à 4^m,70 au-dessous d'un sol plus élevé, ce qui leur fait des différents niveaux. Les eaux sont très différentes.

De ces nombres, on peut tirer tout de suite quelques conclusions rien qu'en les rapprochant, en tenant seulement compte des variations qu'ils subissent et non des matériaux qu'ils représentent.

La densité des puits sur un étroit espace comme celui de la carte témoigne d'abord de l'existence d'un vaste réservoir d'eau souterraine. Je ne voudrais pas dire d'une puissante nappe d'eaux souterraines, car il n'y a pas qu'une nappe : chaque puits a la sienne à un niveau différent de l'autre, quelquefois même à des niveaux très différents à petite distance.

Il n'y a pas deux eaux qui se ressemblent dans tous ces puits, et le même puits ne fournit pas la même eau à 15 jours de distance. La température est variable aussi, le même jour et d'un jour à l'autre.

Bref, l'industrie des habitants aurait visé à se faire, aux

dépens de l'eau de pluie, toujours très pure, de l'eau de puits, toujours très impure, qu'elle y aurait très bien réussi.

Si nous abordons maintenant ce point, nous pouvons comparer la composition moyenne des eaux de Montsalvy avec celles des eaux de la même région, prises aux environs de Montsalvy. Voici quelques-unes des analyses faites : s. et p. sont les sources et les puits.

EAUX DES ENVIRONS DE MONTSALVY

Nos d'ordre	Origine	Tempre	Résidu	Chaux	Sel marin
300	Abiouradou, s.	11,0	174	17	45,0
301	La Grangeotte, s.	10,8	41	3	5,0
302	Labesserette, p.	?	128	13	15,0
303	— s.	12,2	67	4	6,0
304	Boussaroque, s.	11,0	39	2	6,0
305	— s.	9,4	55	2	6,0
306	La Morinie, s.	10,6	67	6	8,0
307	Junhac, s.	11,0	42	2	6,0
308	Sansac-Veinazès, s.	12,0	60	2	6,0
309	Le Bouissou, s.	11,2	57	2	8,0
310	La Feuillade, p. I.	9,8	26	3	7,0
311	— II.	?	24	3	4,0
312	La Roumyguière	11,	64	3	5,0
313	Peyrebrune, s.	11,0	22	1	2,0

Observations. — 300 et 301, haut du ravin qui va de Montsalvy au Lot. — 302, puits Vaissière. — 303, source du village. — 304, source en face de l'étang. — 305, source de la ferme. — 306, captage de M. Nugou. — 307 et 308, sources du village. — 309, source au bord de la route. — 310, 311, puits de chez le maréchal-ferrant. — 312, source du ravin. — 313, source de l'enclos.

L'étude de ce tableau, comparé avec le tableau précédent, conduit aux conclusions suivantes :

1° La preuve de la contamination des eaux de Montsalvy est faite par l'apparition, dans l'eau des puits, de 2 éléments, presque absents dans les eaux vierges de la même région géologique : la chaux et le chlore. La chaux, qui fait ici surtout défaut et qui est presque aussi absente que sur les hauts sommets du terrain volcanique, est apportée par les aliments de l'homme et des animaux ; c'est de l'intestin qu'elle passe dans les puits où sa proportion est parfois 50 fois plus grande que la proportion normale. La chaux

a ici la même valeur diagnostique que le chlore dans les terrains volcaniques.

Le chlore provient lui aussi des écuries et des fumiers, et il y en a dans certains puits 50 fois plus que dans les eaux vierges, encore faut-il remarquer que ces dernières, lorsqu'elles circulent dans la nappe sous des sols non habités, mais cultivés, leur ont emprunté en les traversant un peu de la chaux et du chlore apportés par le fumier, ce dont on voit quelques exemples dans les villages aux environs de Montsalvy. Qnand elles circulent sous les sols en friche ou couverts de bois, la chaux n'y dépasse pas, en terrain de gneiss, 1 mgr. et le chlore 3 mgr. par litre, tandis que dans l'eau des puits nons trouvons des chiffres de 107 mgr. de chaux et de 200 mgr. de sel marin. (N^{or} 284, 275, 276, 283, 287, 288.)

2° Si grande qu'elle soit, la variation de la chaux et du sel marin n'est qu'une fraction assez faible de la variation du résidu d'évaporation, qui ne dépasse pas 40 mgr. en amont et en aval de la ville, tandis qu'il dépasse 600 mgr. dans les puits 283, 286 et 287. D'une manière générale, ce chiffre va en augmentant à mesure que l'on s'approche du centre de l'agglomération, et diminue quand on s'en éloigne.

Il y aurait eu là une étude intéressante à faire : chercher de quoi se compose, dans le résidu total, tout ce qui n'est ni de la chaux, ni du sel marin : silice (qui en fait la plus grande partie), matières organiques, sels ammoniacaux, nitrates, peut-être de l'urée.

Ces renseignements n'étaient pas faits pour plaire à ceux qui ne les demandaient pas, et je me suis abstenu de les fournir dans le détail. Je n'en dirai que ceci : les eaux du puits 288, creusé dans la cave d'une maison très sale, réduisent faiblement l'hypermanganate de potasse en solution acide ou alcaline. Elles ne contiennent pas d'ammoniaque, les nitrates y sont abondants et atteignent des chiffres compris entre 100 et 200 mgr. de potasse par litre. Dans un autre puits (291, 292) il m'est arrivé de les voir cristalliser, pendant l'évaporation d'un litre d'eau, au fond de la capsule.

3° On peut inférer de là que malgré toutes ces causes de pollution, le sol poreux et absorbant de la petite ville en protège les habitants à leur insu en nitrifiant, avant de la laisser arriver dans

le puits, la matière organique qui le traverse. Tel était au moins le cas après l'été pluvieux de 1897.

Pendant un été sec, la situation peut être meilleure, mais cet équilibre de nitrification n'est pas assez stable pour qu'on puisse compter sur lui. Nous venons de le voir troublé pour le puits nº 288 qui recevait de l'extérieur de la matière organique incomplètement transformée. On peut prévoir qu'il ne se réalisera pas constamment, dans tous les temps et dans tous les lieux, et que, par conséquent, les habitants sont toujours exposés à retrouver dans leur eau de boisson un peu de la matière organique et quelques-uns des microbes provenant de leur fumier et de leurs déjections.

4º En acceptant l'hypothèse la plus favorable, celle où la nitrification de la matière organique, garantissant son innocuité, serait toujours assurée, l'eau des puits n'en contiendrait pas moins, à côté des nitrates, tous les autres matériaux des excréments ou des fumiers que le sol ne retient pas : à savoir, le chlorure de sodium et les phosphates des urines : je ne parle pas, le cas échéant du bacille typhique.

Les eaux des puits que j'ai déjà étudiées atteignent à ce point de vue à un degré exceptionnel d'impureté. Il y en a qui sont sensiblement salées au goût, et la proportion moyenne d'acide phosphorique y atteint 25 mgr. par litre. C'est environ 50 fois plus que dans les eaux vierges de la région, qui en contiennent moins de 0 mgr. 5 par litre. C'est, d'un autre côté, 50 fois moins que dans l'urine.

5º Nous arrivons donc par différentes voies à cette conclusion : que l'eau des puits de Montsalvy était, après les pluies abondantes de 1897, un mélange d'un litre d'urine avec 50 litres d'eau de pluie. La proportion d'urine doit être plus considérable pendant les étés secs, parce que l'eau est plus rare. C'est aux intéressés de savoir s'ils admettent une compensation. On leur dit que c'est pour cela qu'ils se portent mal; mais ils sont libres de ne pas l'admettre. En tout cas il est curieux de voir une population vivre et croître dans de pareilles conditions d'insalubrité. Il ne faut pas évidemment la prendre pour exemple. Un pareil milieu, acceptable pour ceux qui sont habitués, est mauvais pour qui le traverse ou s'y implante. Mais l'exemple de Montsalvy, et de beaucoup d'autres localités que je pourrais signaler dans le Can-

tal, si je ne craignais de m'y faire lapider, montre avec quelle puissance la nature travaille pour conserver les espèces, même celles qui ne se défendent pas.

Il ne faudrait pas croire non plus que le Cantal est le seul département de France qui fournisse des exemples pareils à ceux que nous venons de passer en revue. Montsalvy représente une petite ville un peu en retard sur son temps, mais qui s'est formée sur le même modèle que les autres: deux ou trois maisons qui se donnent rendez-vous autour d'un puits ou d'une source, auprès desquels de nouveaux groupements viennent s'agréger, en restant le plus possible fidèles aux habitudes prises en fait d'eau potable, jusqu'au moment où le puits ou la source sont devenus insuffisants ou se révèlent pollués. C'est ainsi que se forment les grandes villes, sans aller jamais bien vite dans la voie du progrès, et Paris lui-même, à l'époque où Boussingault a fait une campagne contre ses eaux de puits, était aussi une sale ville, qui s'alimentait en vertu de principes pareils à ceux que nous avons rencontrés à Montsalvy.

Je crois qu'il serait temps d'imiter partout l'exemple donné par Paris et les grandes villes, d'aller chercher de l'eau autre part que sur place, dans les régions habitées, pour l'amener pure et saine dans la ville ou le village. Seulement il faut pour cela qu'on puisse dire avec suffisamment d'assurance quel est pour chaque localité le secteur dans lequel il faut chercher. Et c'est pour cela qu'un travail fait en chaque département, analogue à celui que nous venons de faire pour le Cantal, rendrait des services.

Le gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE AVRIL 1904 N° 4

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Suite d'expériences relatives au phénomène de l'agglutination DES MICROBES

Par M. CHARLES NICOLLE

Directeur de l'Institut Pasteur de Tunis.

Le travail que nous présentons aujourd'hui est l'exposé, aussi simple que possible, d'un certain nombre d'expériences relatives au phénomène de l'agglutination des microbes. Ces expériences portent sur des points très différents, elles ont été pratiquées d'ailleurs à des époques diverses. Le lien qui unit les différents chapitres où nous les rangerons est donc artificiel. Il nous a semblé cependant préférable de les grouper plutôt que d'en faire l'objet de notes spéciales.

La multiplicité même des questions que nous devons aborder ne nous a pas permis de donner pour chacune d'elles l'énumération des travaux antérieurs. Nous nous en excusons. Nous ne pouvions agir autrement, sous peine d'entrer dans des développements hors de proportion avec l'importance de nos recherches. Le lien le plus naturel qui unisse nos expériences est l'uniformité de la technique que nous avons suivie.



NÉCESSITÉ D'UNE TECHNIQUE UNIFORME POUR L'ÉTUDE DU PHÉNOMÈNE DE L'AGGLUTINATION.

Il ne semble pas que les auteurs qui ont étudié le phénomène de l'agglutination se soient toujours astreints à une technique uniforme.

Si nous bornons nos remarques au bacille typhique, le mieux

étudié de tous les microbes à ce point de vue, nous voyons que le réactif passif de l'agglutination, la culture, varie essentiellement avec les différents auteurs. Les uns se servent de cultures en bouillon ordinaire, d'autres préfèrent des bouillons spéciaux, d'autres enfin ne font usage que d'émulsions de cultures sur milieux solides.

L'âge de la culture est tout aussi variable, la réaction du milieu l'est également. De même, le temps pendant lequel on laisse agir le sérum sur la culture avant d'arrêter les résultats de l'expérience; de même aussi la température à laquelle on fait l'expérience. En un mot chacun emploie sa méthode propre, et cette méthode n'est pas toujours identique pour les expériences d'un même auteur.

Aussi n'est-il pas étonnant de constater que, placés dans des conditions aussi variables, des observateurs, étudiant un même phénomène, aient obtenu parfois des résultats sensiblement différents. Il est certain qu'en particulier les chiffres donnés pour l'appréciation du pouvoir agglutinant ne peuvent être mis en parallèle d'un auteur à l'autre,

Il serait très désirable qu'une même technique fût adoptée qui rendît comparables les résultats obtenus.

C'est ce qu'avait compris M. Sacquepée[1], qui le premier montra la nécessité d'employer toujours comme réactif passif une culture de la même abondance, et qui s'astreignit à cette règle dans ses travaux. La culture dont il convient de faire usage, d'après cet auteur, doit présenter exactement le trouble que donne le nitrate d'argent, lorsqu'on l'ajoute à une solution de NaCl à 0,10 pour mille dans l'eau distillée.

Nous préférons au mélange de M. Sacquepée, dont l'aspect est, à notre avis, trop différent de celui que présente une culture en bouillon de bacille typhique, le réactif suivant dont nous avons précisé la formule avec M. Catouillard.

On prépare d'une part une solution de bicarbonate de potasse à 1/100, d'autre part une solution d'acétate neutre de plomb au même titre. A 100 centimètres cubes de la seconde solution, il suffit d'ajouter cinq gouttes (compte-gouttes de Duclaux) de la première pour obtenir le degré de trouble voulu. Le mélange *mis dans un tube à essai* présente un aspect extrêmement voisin

1. Sacquepée, *Ces Annales*, 15 avril 1901.

de celui que donne une culture de bacille typhique en bouillon de 16 à 18 heures, il ne s'en différencie que par une teinte un peu spéciale et une légère fluorescence.

Les cultures dont nosunous sommes servis dans nos recherches sur l'agglutination (sauf pour les plus anciennes, ont été préparées en nous conformant à cette règle. Nous avons fait usage d'une manière constante de cultures en bouillon peptoné de 16 à 18 heures (étuve à 35°).

Un inconvénient du bouillon, c'est que le bacille typhique y donne souvent un voile et de faux amas; cet inconvénient est très fréquent et des plus gênants. On peut même dire que la présence d'amas spontanés dans la culture rend impossible l'étude du phénomène de l'agglutination.

Il est facile d'empêcher cet accident. Nous avons observé que les amas spontanés et le voile ne se produisent qu'en milieu nettement alcalin. Il suffit donc, pour les éviter, de faire exclusivement usage d'un bouillon neutre. Dans ce milieu, le bacille typhique le plus enclin à produire des amas spontanés ne donne, après quelques passages, que des cultures rigoureusement homogènes.

Les cultures en bouillon neutre sont un peu moins riches en microbes que celles en bouillon alcalin. Leur trouble, après 16 ou 18 heures de séjour à l'étuve, est précisément celui que présente la solution qui nous sert de réactif.

Pour plus de rigueur, nous avons pris l'habitude de ne faire usage, dans une même série d'expériences, que de tubes d'un même bouillon. Nous en préparons une provision à l'avance.

Jamais nous ne mettons le mélange de la culture et du sérum à l'étuve. Nous pensons que ce serait compliquer inutilement la technique, en obligeant à prendre des précautions d'aseptie auxquelles il n'est pas possible de s'astreindre en pratique.

Pour la même raison nous arrêtons nos expériences après une heure de contact. Il est certain qu'en laissant agir le sérum un temps plus long sur la culture, nous obtiendrions des chiffres plus élevés. Il suffit que ceux-ci soient comparables.

Nous déterminons le taux du pouvoir agglutinant au microscope. Le chiffre que nous indiquons comme représentant le degré d'activité du sérum est celui de la dilution la plus étendue à laquelle le microscope montre des amas nombreux, indiscu-

tables, constitués par la réunion de 5 à 10 microbes tout au moins, épars au milieu de microbes isolés, ceux-ci étant en nombre restreint et ne présentant que des mouvements, ralentis ou nuls.

* * *

COURBE TYPE DE L'AGGLUTININE DANS LE SÉRUM SANGUIN D'UN LAPIN INOCULÉ AVEC UNE CULTURE VIVANTE DE BACILLES TYPHIQUES

Courbe de l'agglutinine active.

Aucun auteur, à notre connaissance, n'a publié de courbe complète de l'agglutinine chez les animaux inoculés expérimentalement. Chez l'homme atteint de fièvre typhoïde, le pouvoir agglutinant est soumis à des variations incessantes; la courbe de l'agglutination est par conséquent très irrégulière. Certains auteurs ont avancé qu'il en était de même chez les animaux infectés. Nous n'avons pas constaté ces variations dans nos expériences; ce résultat est dû probablement à la technique que nous avons suivie.

Le type de la courbe de l'agglutinine dans l'infection typhique expérimentale est réalisé par l'expérience suivante (Voir TABLEAU I).

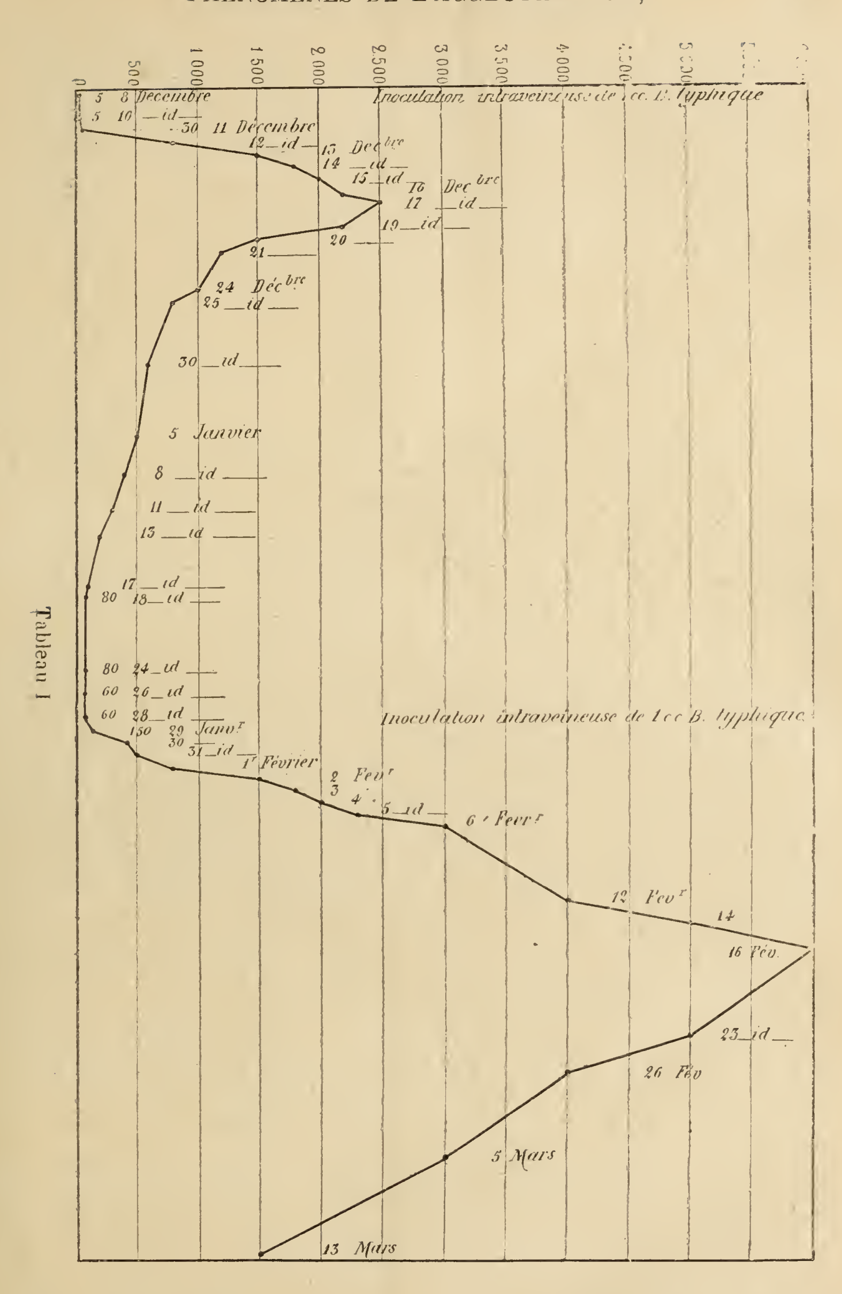
LAPIN 22. — Le pouvoir agglutinant normal du sérum sanguin de ce lapin est de 1/10 vis-à-vis du bacille typhique. — Le 8 décembre 1898, inoculation intraveineuse d'un c. c. d'une culture de 24 heures en bouillon de bacille typhique.

Taux du pouvoir agglutinant : le 8 décembre (10 minutes après l'inoculation) 1/10 : les 9 et 10 décembre : 1/5, le 11 : 1/30, le 12 : 1/800, le 13 : 1/1500, le 14 : 1/1800, le 15 : 1/2000, le 16 : 1/2200, le 17 (9e jour) : 1/2500 (chiffre maximum), le 18 et 19 : 1/2200, le 20 : 1/1300, le 21 : 1/1200, les 22, 23, 24 : 1/1000, le 25 : 1/800, les 26, 27, 28, 29 et 30 : 1/600, le 31 décembre et les 1, 2, 3, 4, 5 janvier : 1/500, les 6, 7, 8 janvier : 1/400, les 9, 10, 11 : 1/300, 12 et 13 : 1/200, 14, 15, 16, 17 : 1/100, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 : 1/80, 26 et 28 1/60. (Pour la suite de la courbe voir le chapitre suivant.)

On rapprochera de cette courbe, typique et complète, les courbes atypiques qui seront données plus loin.

Elles lui sont toutes superposables, rapportées à la même échelle, du jour de l'inoculation de la culture jusqu'au moment où un accident créé artificiellement par nous est venu les modifier.

De ces faits, on peut conclure que la courbe de l'agglutinine, chez le lapin infecté expérimentalement par l'inoculation d'une



culture de bacille typhique, présente successivement les phases suivantes : 1° une période d'incubation de 3 jours pendant laquelle

le sérum ne montre aucun pouvoir agglutinant, à moins qu'il n'en possède un normal; 2° une période d'ascension rapide, aboutissant, du 9e au 15e jour, à un maximum égal pour une même quantité de culture inoculée; 3° une période de descente, d'abord assez rapide, puis de plus en plus ralentie. Le pouvoir agglutinant extraordinairement réduit peut persister pendant plusieurs mois dans le sérum avant de disparaître.

***

MODIFICATIONS DE LA COURBE DE L'AGGLUTININE CONSÉCUTIVES A UNE NOUVELLE INOCULATION DE CULTURES DU MÊME MICROBE.

Lorsqu'un lapin, inoculé préalablement avec une culture de bacille typhique, reçoit ultérieurement une seconde culture du même microbe, la courbe de l'agglutinine se trouve modifiée chez lui d'une façon très différente suivant que la seconde inoculation est faite dans la période d'ascension de l'agglutinine, au début ou à la fin de la période de descente.

Les expériences suivantes montrent ces modifications :

I° La seconde inoculation est faite a la fin de la période de descente. — L'étude de la seconde partie de la courbe du lapin 22 (voir Tab. I) donne un exemple de ce qui se passe dans ce cas.

On assiste au développement d'une seconde courbe, identique comme forme à la première, quoique présentant une amplitude plus grande. La seule différence à noter est l'absence de période d'incubation. Dès le lendemain de l'inoculation, le pouvoir agglutinant remonte pour atteindre rapidement un chiffre élevé.

Lapin 22 (*suite*). — Le 28 janvier, le pouvoir agglutinant étant de 1/60, on pratique une nouvelle inoculation intraveineuse de 1 c. c. d'une culture de bouillon de 24 heures de bacille typhique.

Taux du pouvoir agglutinant : 29 janvier : 1/150, 30 : 1/400, 31 : 1/500, 1er février : 1/800, 2 : 1/1500, 3 : 1/1800, 4 : 1/2000, 5 : 1/2300, 6 : 1/3000, 12 : 1/4000, 14 : 1/5000, 16 (15e jour) : 1/6000 (chiffre maximum), 19 et 23 : 1/5000, 26 : 1/4000, 1er et 5 mars : 1/3000, 13 : 1/1500.

II° La seconde inoculation est faite au début de la période d'ascension. — L'observation de la courbe du lapin 12 montre ce qui se passe dans ce cas (voir Tableau II).

La seconde inoculation faite 4 jours après la première, c'est-à-dire vers la 48e heure après l'apparition de la réaction agglutinante, a déterminé un arrêt de 3 jours dans la montée. Après cet

arrêt, l'ascension s'est faite rapidement pour atteindre un chiffre voisin de celui obtenu consécutivement à l'inoculation de la seconde culture chez le lapin n° 22. La descente de la courbe a eu lieu comme dans le cas précédent.

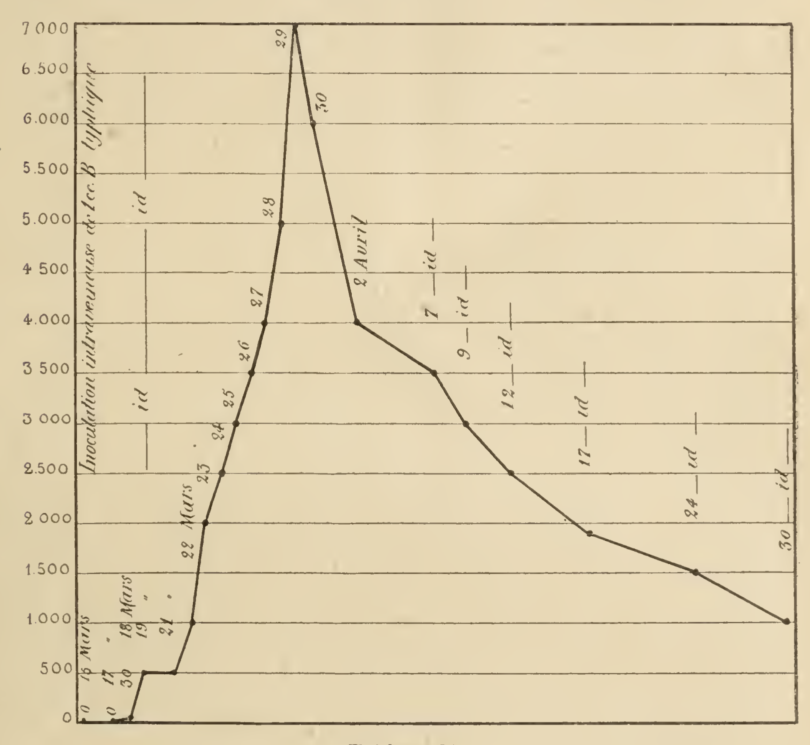


Tableau II.

Lapin 12. — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/1. Le 15 mars 1899, inoculation intraveineuse de 1 c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de bacille typhique.

Taux du pouvoir agglutinant : les 16 et 17 mars : 0; 18 : 1/30, 19 : 1/500. Le même jour et quelques heures avant la constatation de ce pouvoir seconde inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture de bacille typhique. Les 20 et 21 : 1/500, 22 : 1/1000, 23 : 1/2000, 24 : 1/2500, 25 : 1/3000, 26 : 1/3500, 27 : 1/4000, 28 : 1/5000, 29 : 1/7000 (chiffre maximum), 30 : 1/6000, 31 mars, 1er et 2 avril : 1/4000, 3, 5 et 7 avril : 1/3500, 9 : 1/3000, 12 : 1/2500, 17 : 1/1900, 24 : 1/1500, 30 : 1/1000.

III° La seconde inoculation est faite au début de la période de descente. — Dans ce cas, on observe à la suite de l'inoculation un arrêt de 3 à 4 jours dans la descente, puis le pouvoir aggluti-

nant se relève et dépasse rapidement le maximum primitivement atteint, sans présenter toutefois un chiffre aussi élevé que lorsque l'inoculation est pratiquée au début de l'ascension ou tout à fait à la fin de la descente.

C'est du moins ce qui semble ressortir de l'observation des 2 courbes suivantes (voir Tableaux III et IV).

Lapin 70 (Tableau III). — Pouvoir agglutinant normal, de 1/5 à 1/10, vis-à-vis du bacille typhique. Le 5 janvier 1899, inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture en bouillon de 24 heures de bacille typhique.

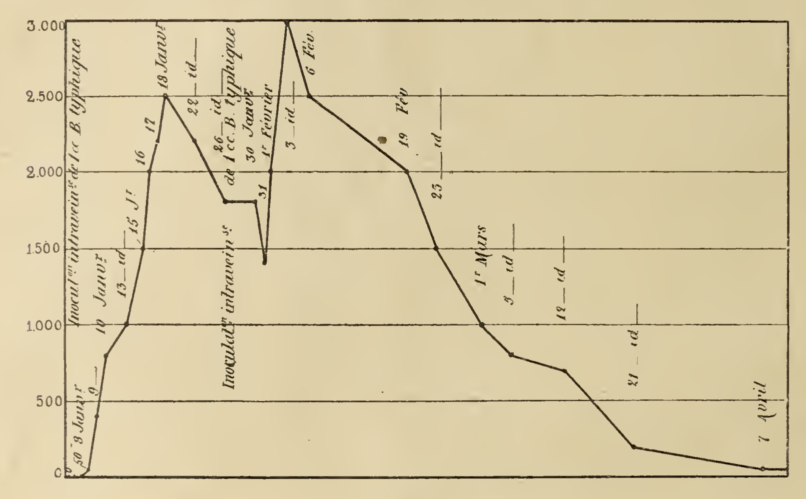


Tableau III.

Taux du pouvoir agglutinant: les 6 et 7 janvier [1] : 0, le 8 : 1/50. 9 : 1/400, 10 : 1/800, 13 : 1/1000, 15 : 1/1500, 16 : 1/2000, 17 : 1/2200, 18 (12e jour) : 1/2500 (chiffre maximum), 19 : idem, 22 : 1/2200, 26 : 1/1800. Le 27 janvier, seconde inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture de bacille typhique; les 28. 29, 30 : 1/1800, le 31 : 1/1400, le 1er février : 1/2000, le 3 : 1/300 (second maximum), le 4 : idem, les 5 et 6 : 1/2500, les 8, 10, 12, 16 et 19 : 1/2000, le 23 : 1/500, les 26 et 1er mars : 1/1000, le 5 mars : 1/800, le 12 : 1/700, le 21 : 1/200, les 31 mars et 7 avril : 1/100, le 30 avril : 1/70.

On remarquera la lenteur excessive de la descente.

Lapin 21 (Tableau IV). — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/1. Le 10 janvier 1903, inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture en bouillon de 24 heures de bacille typhique.

1. Il est à remarquer que lorsque le sérum présente un pouvoir agglutinant normal, l'inoculation a généralement pour effet d'abaisser ce pouvoir dans les 2 jours qui suivent (voir également lapin 22). Ce fait est à rapprocher de l'arrêt que subit l'ascension du pouvoir agglutinant lorsqu'une nouvelle inoculation est pratiquée peu de jours après la première.

Taux du pouvoir agglutinant : les 11 et 12 janvier : 0, le 13 : 1/3, les 14 et 15 : 1/10, le 16 : 1/30, le 18 : 1/100, le 20 : 1/900, le 21 : 1/1000, le 24

Tableau IV.

(11e jour) : 1/200 (chiffre maximum), le 26 : 1/1500, le 30 : 1/1200. Le 31 janvier, seconde inoculation intraveineuse de 1 c.c. de culture de bacille typhique ; les 1er et 2 février : 1/1000, le 3 : 1/1200, le 4 : 1/1500, le 5 : 1/2500, le 6 : 1/3000, le 8 : 2/4000 (second maximum), le 9 : 1/3000, le 11 : 1/2000. (La suite de la courbe indique l'effet de saignées répétées ; voir le chapitre suivant).



INFLUENCE DES SAIGNÉES SANGUINES SUR LA COURBE DE L'AGGLUTININE.

Il était intéressant de rechercher quelle peut être l'influence d'une ou de plusieurs saignées sur le développement de la courbe de l'agglutinine. Dans nos expériences, nous avons pratiqué

exclusivement les saignées dans la période de descente de la courbe, et nous avons constaté que leur effet constant est d'arrêter momentanément la baisse du pouvoir agglutinant ; souvent même celui-ci se relève pendant les jours qui suivent. Toute saignée étant suivie d'une augmentation du nombre des globules blancs, il résulte de ce fait une présomption en faveur du rôle de ceux-ci dans la production de l'agglutinine.

Même observation avait déjà été faite au sujet de l'influence

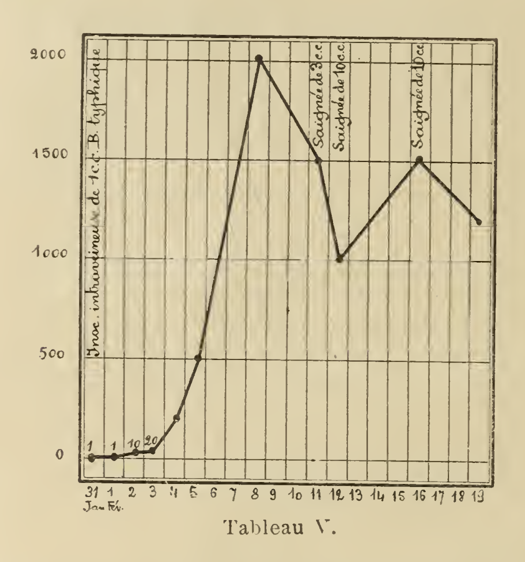


Tableau V.

de la saignée sur la courbe de l'antitoxine, chez les chevaux producteurs du sérum antidiphtérique.

Lapin 25 (Tableau V). — Pouvoir agglutinant normal du sérum de ce lapin : 1/1 vis à vis du bacille typhique. Le 31 janvier 1903, inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture de bouillon de 24 heures de bacille typhique.

Taux du pouvoir agglutinant : 1er février : 1/1, le 2 ; 1/10. 3 : 1/20. 4 : 1/200, 5 : 1/500, 8 : 1/2000 (chiffre maximum), 11 : 1/1500. Le même jour petite saignée cardiaque de 3 c. c. Cette saignée minime s'est montrée sans effet sur la courbe : le 12 février le pouvoir agglutinant a baissé à 1/1000. Le même jour, saignée cardiaque de 10 c. c. Le 16, le pouvoir agglutinant est de 1/1500, il s'est donc notablement relevé. Une nouvelle saignée de 10 c. c. ne l'empêche pas de retomber le 19 à 1/1200.

Lapin 23 (Tableau VI). — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/1 vis-à-vis du bacille typhique. Le 31 janvier 1903, ce lapin reçoit dans les veines une inoculation de 1/2 c. c. de culture en bouillon de bacille typhique, et de plus

une quantité égale de culture de bacille de Friedlænder ; nous verrons plus loin que l'adjonction de ce microbe au bacille typhique ne modifie nullement la courbe de l'agglutinine.

Taux du pouvoir agglutinant : 1er et 2 février : 0, le 3 février : 1/20, 4 : 1/50, 5 : 1/500, 9 : 1/1500 (maximum), 12 : 1/1000. Ce même jour, saignée cardiaque de 10 c. c. Le pouvoir agglutinant cesse aussitôt de descendre ; il est le 13 de 1/1000 ; le 16 il remonte à 1/1500. Une nouvelle saignée de 10 c. c. pratiquée ce même jour ne l'empêche pas de tomber à 1/500 le 19.

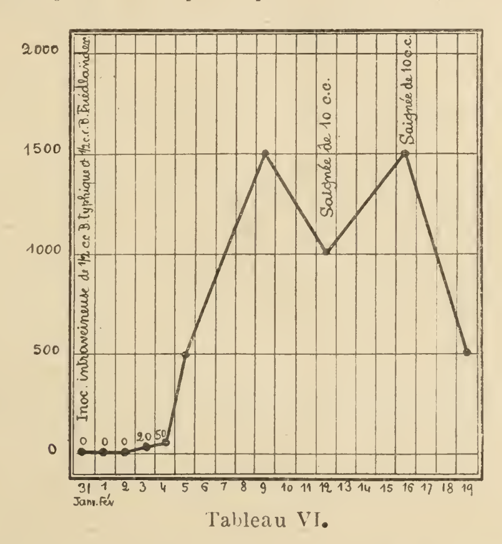


Tableau VI.

LAPIN 27. — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/1. Le 26 février 1903, inoculation de 1/4 de c. c. d'une culture en bouillon de 24 heures de bacille typhique sous la peau.

Taux du pouvoir agglutinant : 1er mars : 0, 4 : 1/10, 5 : 1/20, 6 : 1/60 (chiffre maximum). 8 et 9 : 1/50. Ce dernier jour, saignée cardiaque de 10 c. c. ; le 10 et le 12 : pouvoir agglutinant 1/50. Ce dernier jour, seconde saignée de 10 c. c., le 13 même pouvoir.

LAPIN 21 (voir TABLEAU IV). — Ce lapin, dont la courbe a été en grande partie donnée dans le chapitre précédent, a subi, on se le rappelle, 2 inoculations de cultures typhiques. La première pratiquée le 10 janvier a provoqué une réaction agglutinante ayant eu son maximum à 1/2000 le 24 janvier ; la seconde, pratiquée le 31, a été suivie d'un second maximum de 1/4000 le 8 février. Le lendemain le pouvoir est descendu à 1/3000, le 11 il est de 1/2000. Ce même jour, saignée cardiaque de 6 c. c., le 12 le pouvoir agglutinant est encore de 1/2000. Ce même jour, nouvelle saignée de 10 c. c. Le 13, pouvoir agglutinant de 1/2000 ; le 16, il atteint encore le même chiffre. Une troisième saignée de 10 c. c. n'empêche pas l'agglutinine de baisser rapidement en 3 jours à 1/500.

LAPIN 31. — Nous avions constaté antérieurement un fait analogue chez

ce lapin, soumis, du 1er novembre au 6 décembre 1898, à 8 inoculations sous-cutanées de 1 c. c. de culture typhique.

Le pouvoir agglutinant, qui avait atteint quelques jours avant 1/10000, était tombé le 20 décembre à 1/2000. Nous pratiquons au lapin une saignée de 20 c. c., le lendemain le pouvoir agglutinant est encore de 1/2000.

La conclusion à tirer de ces expériences est qu'une saignée pratiquée pendant la période de descente de la courbe de l'agglutinine provoque d'une façon constante un arrêt dans la baisse de celle-ci.

Une seconde saignée, pratiquée à peu de distance de la première, a souvent, mais non constamment, le même effet. Une

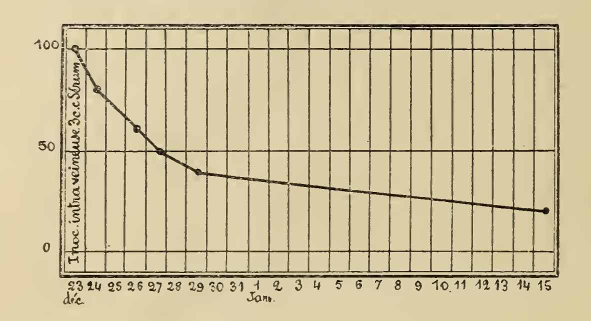


Tableau VII.

saignée nouvelle paraît accélérer plutôt la rapidité de la descente.

*
* *

COURBE DE L'AGGLUTININE CHEZ LES ANIMAUX AYANT REÇU UNE INOCULATION DE SÉRUM AGGLUTINANT (*Courbe de l'agglutinine passive*).

Dans ce cas, l'organisme de l'animal ne réagissant pas vis à vis de la substance inoculée, il y a baisse régulière du pouvoir agglutinant du sérum à partir du moment de l'inoculation. Cette baisse se fait lentement.

Les deux observations suivantes le démontrent :

LAPIN 77 (voir TABLEAU VII). — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/1 vis-à-vis du bacille typhique.

Le 23 décembre 1899, ce lapin reçoit dans les veines une inoculation de 3 c. c. du sérum d'un autre lapin injecté préalablement avec des cultures typhiques. Ce dernier sérum est agglutinant à 1/4000.

Taux du pouvoir agglutinant chez le lapin 77 : le 23 décembre, 1 heure après l'inoculation : 1/100, le lendemain 24 décembre : 1/80, le 25 et le 26 :

1/60, le 27 : 1/50, le 29 : 1/40, le 2 janvier : 1/40, le 15 janvier : 1/20.

Lapin 48. — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/4 vis-à-vis du bacille typhique.

Le 21 décembre 1901, inoculation dans les veines de 5 c. c. d'un sérum de lapin actif à 1/2000.

Taux du pouvoir agglutinant, 2 heures après l'inoculation : 1/75; le lendemain 22 : 1/35, le 23 : 1/30, les 24, 25, 26 et 27 : 1/20, le 29 : 1/15, le 30 : 1/10, le 1er janvier nul à 1/10.

* * *

EXPÉRIENCES SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DE L'AGGLUTININE.

I. Action de la chaleur sur l'agglutinine. — Nous avons montré antérieurement avec Halipré[1] que le pouvoir agglutinant du sérum typhique n'est pas sensiblement modifié par un chauffage d'une 1/2 heure à 60°. Les expériences suivantes permettent de préciser l'action de la chaleur sur l'agglutinine.

1re Expérience. — Le sérum frais d'un lapin, inoculé préalablement avec une culture typhique, donne, mélangé à une culture en bouillon de 18 heures, des amas très volumineux à 1/300, des amas moyens bien visibles à 1/800, petits à peine perceptibles à l'œil à 1/1000. Au microscope, l'agglutination peut être constatée jusqu'à 1/1500. Tous ces chiffres représentent les résultats constatés après 1 heure de contact.

Ce même sérum est essayé sur la même culture après avoir été préalablement porté pendant 1/2 heure aux températures suivantes : 50°, 55°, 60°, 65°, 75°.

Sérum porté à 50° et 55°. — Il se comporte vis-à-vis du bacille typhique exactement comme le sérum non chauffé.

Sérum porté à 60°. — Mêmes résultats. Cependant, à 1/1000, il n'y a plus agglutination visible à l'œil nu; au microscope, les amas moins volumineux à cette dilution sont à peine perceptibles à 1/1500.

Sérum porté à 65°. — L'agglutination est des plus faibles au microscope à 1/1500; elle est déjà peu marquée à 1/800 et médiocre à 1/500. Le phénomène n'est appréciable à l'œil nu qu'à cette dernière.

Sérum porté à 70°. — L'agglutination n'est plus visible à l'œil nu aux dilutions employées; elle est encore ébauchée au microscope à 1/500. A cette température, le sérum présente un trouble manifeste, début de la coagulation.

L'agglutinine insensible aux températures inférieures à 55° est donc très légèrement atteinte entre 55° et 60°; elle perd une partie très notable de son activité entre 60° et 65°, mais elle n'est pas encore totalement détruite à 70°.

1. C. Nicolle et A. Halipré, *Presse médicale*, 25 juillet 1896.

2e Expérience. — Cette expérience porte sur le sérum d'un lapin (no 17), ayant reçu, le 14 décembre 1903, une inoculation sous-cutanée de 1/2 c. c. d'une culture de bacille dysentérique (Shiga) portée préalablement pendant 1/2 heure à 65o. Le même lapin reçoit encore sous la peau, le 7 janvier, 1 c.c. d'un mélange à parties égales d'une culture vivante de bacille typhique et d'une culture du même bacille dysentérique, chauffée 1/2 heure à 60o.

Courbe des agglutinines typhique et dysentérique dans le sérum chauffé ou non de ce lapin :

Avant l'inoculation typhique : pouvoir agglutinant sur le bacille dysentérique au 20 décembre : sérum non chauffé : 1/40. chauffé à 60o (3/4 d'heure) 1/30, le 26 décembre, sérum non chauffé : 1/20, chauffé à 62o (1/2 heure) : 1/10, le 1er janvier sérum non chauffé : 1/10 (faible), chauffé à 58o (1/2 h.) : 1/5.

Après la seconde inoculation, le 13 janvier :

1o Sur le bacille typhique : sérum non chauffé : 1/50, chauffé à 55o (20 minutes) : même résultat, à 60o (20 minutes) : 1/50 également, mais un peu plus faible.

2o Sur le bacille dysentérique, respectivement : 1/20, 1/20 et 1/10.

Le 19 janvier :

1o Sur le bacille typhique : sérum non chauffé : 1/50, sérum chauffé à 50o (20 minutes) : 1/50, sérum chauffé à 60o (20 minutes) : 1/50 également.

2o Sur le bacille dysentérique les 3 sérums sont actifs à 1/20.

Donc, résultats analogues à ceux obtenus dans la première expérience et mêmes conclusions; applicables également à l'agglutinine dysentérique.

2e dialyse. — On sait, par les recherches antérieures que l'agglutinine a peu de tendance à traverser les membranes.

Les expériences suivantes confirment cette donnée.

Expérience faite *in vitro*. — Le 16 décembre 1898, 2 sacs de collodion, ayant chacun une contenance de 4 c.c., sont remplis après stérilisation avec un sérum typhique actif à 1/2000, puis placés séparément dans un tube de bouillon stérile.

Trois jours après, le bouillon se montre dépourvu de tout pouvoir agglutinant vis-à-vis du bacille typhique ; même résultat au bout de 10 jours. On met alors les tubes et leur contenu à l'étuve à 35o; 3 jours après, même résultat.

L'agglutinine typhique ne traverse donc pas la paroi d'un sac de collodion.

Expériences faites *in-vivo*. — Ces expériences sont au nombre de 2.

Dans la première, un sac en papier mousseline stérilisé est rempli de bouillon peptoné, puis fermé au collodion et placé dans la cavité péritonéale d'un lapin, le 18 octobre 1897. Ce lapin reçoit ensuite en 4 fois 3 c. c. 1/2 de cultures typhiques en bouillon. Le 1er décembre, on enlève le sac et on

l'ouvre. Son contenu a perdu l'odeur caractéristique des solutions peptonées, il se coagule légèrement par la chaleur. Centrifugé, il montre quelques globules blancs exceptionnels.

Le pouvoir agglutinant du sérum sanguin du lapin est de 1/9000, celui du contenu du sac est de 1/25. Ce pouvoir agglutinant léger doit être attribué à la présence des globules blancs qui ont pénétré à travers la paroi du papier.

Même expérience avec un sac de collodion inclus dans la cavité péritonéale d'un autre lapin le 21 octobre. Ce lapin reçoit en huit fois 9 c. c. de culture de bacille typhique. Le 13 novembre on enlève le sac. Le sérum du lapin est actif à 1/10000, le liquide du sac, clair et faiblement coagulable, se montre dépourvu de tout pouvoir agglutinant.

Ces expériences montrent que l'agglutinine n'a pas plus de tendance à dialyser *in vivo* que *in vitro*. Il semble d'ailleurs que dans l'organisme animal l'agglutinine reste renfermée dans les leucocytes. Il y avait donc double raison pour que nous ne puissions en déceler la présence dans le contenu de nos sacs.



LA PRÉSENCE DE L'AIR N'EST PAS INDISPENSABLE POUR LA PRODUCTION *in vitro* DU PHÉNOMÈNE DE L'AGGLUTINATION

Salimbeni [1] a avancé que la présence de l'air était indispensable à la production *in vitro* du phénomène de l'agglutination. L'expérience suivante semble indiquer que cette opinion est au moins exagérée.

Le 27 janvier 1900, on ensemence avec une goutte de culture de bacille typhique un tube de bouillon recouvert d'huile de vaseline; l'air a été chassé du bouillon par une ébullition prolongée à 115°. On sait que, dans ces conditions, le milieu est à peu près totalement privé d'air, et qu'il convient à la culture des microbes anaérobies les plus stricts [2]. On porte le tube à l'étuve à 35°, le bacille typhique s'y développe lentement; au bout de 48 heures la culture présente cependant un trouble manifeste et uniforme. La quantité de bouillon contenu dans le tube est de 5 c. c.

Nous introduisons sous l'huile de vaseline 5 gouttes de sérum typhique, en évitant avec soin de faire pénétrer de l'air pendant cette manipulation. Une quantité égale du même sérum est ajoutée en même temps à une culture aérobie de bacille typhique du même âge, ramenée par l'addition de bouillon neuf au même degré d'opacité que la culture anaérobie. Dans les deux tubes, l'agglutination se produit en trois minutes à l'œil nu.

1. SALIMBENI, Ces *Annales*, 25 avril 1897.
2. C. NICOLLE, *Société de biologie*, 8 novembre 1902.

* * *

L'AGGLUTINATION DES CULTURES MORTES OU COLORÉES

Le réactif le plus sensible de l'agglutinine est, nous avons insisté déjà sur ce point[1], une culture vivante et jeune. Autant que possible, on ne doit pas faire usage d'un autre réactif pour le séro-diagnostic des maladies.

Cependant, plusieurs auteurs, M. Widal le premier, ont montré que les cultures mortes de bacille typhique restaient sensibles à l'action du sérum, et que l'on pouvait à la rigueur s'en servir pour rechercher la réaction agglutinante lorsqu'on n'a pas mieux sous la main. Une culture jeune tuée est toujours préférable à une culture encore vivante et âgée.

Nous avons recherché comparativement quelles étaient les substances antiseptiques dont l'addition aux cultures typhiques laissait le mieux intacte leur agglutinabilité. Nos expériences nous ont montré que le choix devait être donné au chloroforme, à l'éther, au formol (déjà préconisé par M. Widal) et aux essences. Un grand avantage de ces produits est qu'ils sont volatils, et qu'ils disparaissent de la culture une fois leur action produite.

L'addition d'une goutte de ces substances à 1 c. c. de culture typique jeune amène sa stérilisation complète en un temps qui ne dépasse pas 24 heures. Les premiers jours, la sensibilité de la culture à l'agglutinine est très satisfaisante; à la longue, elle baisse graduellement.

L'emploi de la chaleur n'est pas aussi recommandable; un chauffage à 75° pendant 1 h. 1/2 diminue déjà d'une façon appréciable la sensibilité d'une culture typhique au sérum.

Un moyen élégant de mettre en évidence l'action de l'agglutinine consiste dans l'emploi de cultures colorées.

Pour préparer ce réactif, on traite une culture jeune de bacille typhique successivement par le formol (1 goutte par 2 c. c.) puis par la thionine phéniquée (proportion double). On obtient un liquide trouble et coloré, qui se prête parfaitement à la démonstration de l'action agglutinante. Nous avons pu constater qu'une culture ainsi traitée gardait pendant 60 jours une sensibilité à peu près égale à l'action d'un même sérum, et que

1. C. Nicolle et A. Halipié, *Presse médicale* 25 juillet 1896.

son emploi était préférable à celui de cultures tuées par la simple addition d'un antiseptique.

* * *

PASSAGE DE L'AGGLUTININE TYPHIQUE A TRAVERS LE PLACENTA

La recherche de l'agglutinine typhique dans le sang des enfants nés de femmes atteintes de fièvre typhoïde, ou des petits issus des femelles infectées expérimentalement pendant la période de gestation, a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Nous ne pouvons les rapporter ici ; cet historique nous entraînerait dans des développements que nous jugeons inutiles. Seule, la conclusion de ces expériences ou de ces observations nous intéresse. Cette conclusion est que l'agglutinine passe généralement de la mère infectée ou malade à l'enfant, mais que le sérum sanguin de celui-ci se montre toujours (une seule exception, Étienne, 1899) plus pauvre en agglutinine que celui de la mère. Le pouvoir agglutinant de ce sérum est généralement très faible.

Les observations ou expériences des auteurs sont toutes passibles d'une grave objection. Chez la femme atteinte de fièvre typhoïde, de même que chez la femelle infectée, la présence dans l'organisme maternel des bacilles typhiques et de leurs poisons peut être une cause d'altération placentaire, et dans ces conditions, le passage de quantités toujours faibles d'agglutinine ne prouve pas que cette substance eût été capable de traverser un placenta parfaitement sain. L'intérêt de la question est purement théorique, cela est certain ; mais, puisque le problème a été posé, il nous a paru intéressant d'en chercher la solution en suivant une méthode qui mette nos conclusions à l'abri de l'objection que nous venons de signaler. Cette méthode consiste à inoculer aux animaux, non des cultures ou produits du bacille typhique, mais le sérum agglutinant d'un animal de la même espèce infecté préalablement avec des cultures de ce microbe. Un seul auteur avant nous, Jurewitsch[1], a réalisé cette expérience ; il a constaté que dans ces conditions l'agglutinine passait d'une façon constante de la mère au fœtus, mais que le sérum de celui-ci avait une teneur en agglutinine toujours sensiblement inférieure

1. JUREWITSCH, *Centralblat. f. Bakteriologie*. I. Abt. 1903 Bd. XXXIII, n° 1, page 76.

à celle du sérum maternel. Il est regrettable que Jurewitsch n'ait pas donné le détail de ses expériences (pratiquées sur des lapines et des cobayes) et qu'il n'ait cité aucun chiffre.

Les expériences que nous allons relater permettent de serrer de plus près les faits.

Lapine 72. — Pouvoir agglutinant normal du sérum nul à 1/1. Cette lapine est dans la période ultime de la gestation.

Elle reçoit sous la peau, le 23 septembre 1902, 9 c. c. d'un sérum frais de lapine dont le pouvoir agglutinant est de 1/10,000, et le 24, 14 c. c. du même sérum, soit au total 23 c. c.

Elle met bas, dans la nuit du 24 au 25, six petits dont deux mort-nés. Le pouvoir agglutinant du sérum maternel est alors de 1/150.

L'examen du sérum sanguin des enfants a donné les résultats suivants : pouvoir agglutinant pour les quatre petits vivants : 1/10 chez un, 1/5 chez deux; 1/1 chez le quatrième. Absence d'agglutinine dans le sérum sanguin des deux mort-nés.

Lapine 9. — Pouvoir agglutinant normal du sérum nul à 1/1. Cette lapine est à peu près à moitié de sa gestation.

Elle reçoit successivement sous la peau 3 c. c. d'un sérum frais de lapin dont le pouvoir agglutinant est de 1/8,000 à chacune des dates suivantes : 30 septembre, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 octobre, soit au total 24 c. c. de ce sérum.

Le 8 octobre, la lapine est sacrifiée, elle est à 8 jours environ du terme. Le pouvoir agglutinant de son sérum est de 1/8.

La mensuration du pouvoir agglutinant a été pratiquée à la fois pour le sérum sanguin et le liquide amniotique de chacun des huit fœtus, tous vivants. Les résultats ont été les suivants :

1er petit :	sérum sanguin	1/5;	liquide amniotique,	très faible à 1/1.
2e petit :	—	1/5;	—	1/1.
3e petit :	—	1/1 très faible;	—	1/1 très faible.
4e petit :	—	1/15;	—	1/1 très faible.
5e petit :	—	1/1;	—	1/1.
6e petit :	—	1/1;	—	1/1.
7e petit :	—	1/1 très faible;		
8e petit :	—	1/10.		

Le pouvoir agglutinant du liquide amniotique n'a pas été recherché pour les deux derniers petits.

Lapine 50. — Pouvoir agglutinant normal du sérum nul à 1/1. Cette lapine est aux derniers jours de sa gestation.

Elle reçoit successivement sous la peau 10 c. c. d'un sérum frais de lapin actif à 1/1500, et chacun des jours suivants : 6, 7 et 8 mars 1903, soit au total 40 c. c. de ce sérum.

Elle met bas dans la nuit du 8 au 9, six petits qui sont trouvés morts de froid le lendemain matin.

Le pouvoir agglutinant du sérum maternel est de 1/50. L'examen du sang des petits donne les résultats suivants : pouvoir agglutinant du sérum

de quatre petits nul à 1/2, d'un cinquième très faible à 1/1, du dernier actif nettement à 1/1.

La conclusion à tirer de ces expériences est que l'agglutinine est susceptible de passer du sang de la mère à celui des petits, au travers du placenta intact, mais qu'elle ne le traverse que d'une façon inconstante et seulement à l'état de traces. Ceci ne doit pas nous étonner, puisque nous savons que l'agglutinine ne dialyse que très faiblement ou pas.

On notera, dans la seconde des expériences qui viennent d'être relatées, le passage possible, mais également inconstant et encore plus faible, de l'agglutinine dans le liquide amniotique. Staeubli[1] qui a recherché sa présence dans ce liquide (chez le cobaye), avait déjà noté le faible pouvoir de celui-ci.



RECHERCHE DES AGGLUTININES NORMALES DANS LE SÉRUM SANGUIN DES VAISSEAUX OMBILICAUX AU MOMENT DE L'ACCOUCHEMENT

Grâce à l'obligeance de notre ami le Professeur A. Martin (de Rouen), nous avons pu rechercher la présence des agglutinines normales dans le sérum sanguin des vaisseaux ombilicaux de neuf enfants nouveaux-nés. Nos expériences ont porté sur le bacille typhique, un échantillon de bactérium coli des selles, et sur le bacille de la psittacose. (Nocard).

Une des mères (n° 8) avait eu antérieurement la fièvre typhoïde; une autre (n° 1) présentait de l'albumine dans l'urine au moment de l'accouchement.

N° 1. — Sérum sanguin pris au bout placentaire du cordon. Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur le bacille typhique et le bacille de la psittacose. légèrement actif à 1/10 sur le bactérium coli;

N° 2. — Sérum pris au bout placentaire. — Pouvoir agglutinant nul sur le bacille de la psittacose; faible à 1/1 sur le bacille typhique et le bactérium coli;

N° 3. — Sérum du bout placentaire, Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur le bacille typhique et le bacille de la psittacose, faible à 1/5 sur le bactérium coli;

N° 4. — Sérum du bout placentaire. Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur le bacille typhique et le bacille de et la psittacose, faible à 1/1 sur le bactérium coli;

N° 5. — Sérum du bout placentaire. Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur le bacille de la psittacose, faible à 1/5 sur les deux autres microbes.

1. Staeubli, *Centralblatt f. Bakt.* I. Originale. I. XXXIII, n° 5, 1903, pp. 375-389.

N° 6. — Sérum sanguin pris au bout fœtal. Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur les trois microbes.

N° 7. — Sérum du bout fœtal, même résultat.

N° 8. — Sérum du bout placentaire. Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur les trois microbes. Sérum du bout fœtal, même résultat.

N° 9. — Sérum du bout placentaire. Pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur le bacille typhique et celui de la psittacose, faible à 1/1 sur le bactérium coli Sérum du bout fœtal : pouvoir agglutinant nul à 1/1 sur le bacille typhique, non recherché sur les deux autres microbes.

Ces expériences, sans doute trop peu nombreuses pour qu'il soit permis d'en tirer des conclusions fermes, semblent cependant indiquer la présence fréquente, dans le sérum sanguin des vaisseaux ombilicaux (bout placentaire), de faibles quantités de l'agglutinine du bactérium coli. L'agglutinine typhique y est plus rare et n'y existe qu'à l'état de traces. Nous n'y avons jamais rencontré d'agglutinine active vis-à-vis du bacille de la psittacose. On notera que le sang du bout fœtal du cordon s'est montré dans nos expériences totalement dépourvu de pouvoir agglutinant vis-à-vis des trois microbes employés.

Les résultats de ces expériences sont à rapprocher de ceux rapportés dans le chapitre précédent.

***

LES AGGLUTININES SECONDAIRES

Il est fréquent de voir apparaître dans le sang d'un animal inoculé avec une culture microbienne, en dehors de l'agglutinine spécifique, une ou plusieurs autres agglutinines actives, quoiqu'à un degré infiniment moindre, vis-à-vis d'autres microbes appartenant à des espèces généralement voisines.

Ces agglutinines supplémentaires sont dites *agglutinines secondaires*. Leur présence chez les animaux d'expérience, signalée, croyons-nous, pour la première fois par M. Widal, a été notée par une grand nombre d'auteurs, notamment par M. Rodet et par ses élèves. Elles ont été plus particulièrement observées par eux chez les animaux inoculés avec des cultures de bacille typhique ou de bactérium coli, et se montrent actives réciproquement sur chacun de ces deux microbes.

C'est sans doute à la présence d'une agglutinine du même

ordre qu'est dû le faible et inconstant pouvoir que montre vis-à-vis du bactérium coli le sérum des malades atteints de fièvre typhoïde. M. Sacquepée y voyait la preuve d'une infection secondaire à bactérium coli au cours de la fièvre typhoïde.

Dans un travail antérieur[1], nous avons déjà donné quelques exemples de ces agglutinines secondaires, et indiqué leur signification. Nous apportons aujourd'hui la courbe assez complète d'une de ces agglutinines.

LAPIN 70. — Inoculé le 5 janvier 1899 avec 1 c. c. de culture de bacille typhique dans les veines. La courbe de l'agglutinine typhique du sérum de ce lapin a été donnée plus haut (Voir TABLEAU III).

Le sérum de l'animal ne présentait avant l'inoculation aucun pouvoir agglutinant vis-à-vis du bacille de la psittacose, même à 1/1.

Taux du pouvoir agglutinant vis-à-vis du bacille de la psittacose à partir de l'inoculation typhique : les 7, 8 et 9 janvier, nul à 1/10 ; les 11 et 12 : très faible à 1/10, les 13 et 14 : actif à 1/10, le 15 à 1/15, le 16 (11e jour) à 1/20 (chiffre maximum), les 17, 18, 19, 20 et 23 à 1/10 ; le 26, aucun pouvoir à cette dilution.

Il est intéressant de comparer cette courbe rudimentaire de l'agglutinine secondaire à la courbe bien plus développée de l'agglutinine principale. Ces deux courbes sont presque parallèles.

*
* *

COURBE DE L'AGGLUTININE DANS LES INFECTIONS MIXTES

Il était intéresssant de savoir ce que devient la courbe de l'agglutinine lorsqu'on inocule à la fois, ou successivement à un même animal, des cultures d'un microbe agglutinogène, tel que le bacille typhique, et des cultures d'autres microbes doués ou non de la même propriété.

Un seul auteur, Castellani[2], a entrepris quelques expériences sur ce sujet. Il a opéré sur trois espèces microbiennes, le bacille typhique, le bactérium coli et un bacille pseudo-dysentérique. Les résultats notés par lui peuvent être résumés ainsi : lorsqu'on inocule à un animal un mélange de ces microbes, il y a développement de l'agglutinine spécifique pour chacun d'eux, absolument comme si les cultures avaient été inoculées isolément à des animaux

1. C. NICOLLE et M. TRENEL, Ces *Annales* 1902, pages 582 et suivantes.
2. CASTELLANI, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infections-krankeiten* 1902, 2 mai, vol. XI. p. 1.

différents. Le résultat est le même lorsque l'inoculation de la seconde culture est pratiquée au début ou à la fin de l'infection par le premier microbe. Si la seconde inoculation est faite au cours de l'infection, le développement de l'agglutinine est au contraire tardif et faible.

Des expériences que nous avons réalisées avec des microbes d'espèces différentes et dans des conditions variées nous ont donné les résultats suivants :

Ire EXPÉRIENCE. — INOCULATION DU MÉLANGE D'UNE CULTURE D'UN MICROBE AGGLUTINOGÈNE (BACILLE TYPHIQUE) ET D'UNE CULTURE D'UN MICROBE INAGGLUTINOGÈNE (BACILLE DE FRIEDLAENDER).

Le LAPIN 23 reçoit dans les veines 1 c. c. d'un mélange à parties égales de deux cultures en bouillon de 24 heures, l'une de bacille typhique, l'autre du bacille de Friedlænder. Ces deux cultures ont été laissées 5 minutes en contact.

La courbe de l'agglutinine du sérum de ce lapin a été donnée au tableau VI à propos de l'influence des saignées sur la courbe du pouvoir agglutinant. Il suffit de se reporter à ce tableau pour constater que l'association du bacille de Friedlænder au bacille typhique n'a déterminé aucune modification dans la courbe de l'agglutinine typhique. — La courbe du lapin 25 (tableau V) inoculé le même jour avec une dose double de la même culture typhique et sans adjonction de bacille de Friedlænder, pourra servir de témoin.

Il n'y a pas eu de développement d'agglutinine active vis-à-vis du bacille de Friedlænder.

IIe EXPÉRIENCE. — INOCULATION SUCCESSIVE DE DEUX CULTURES DE MICROBES AGGLUTINOGÈNES (bacille typhique et *bacillus lactis aerogenes*).

LAPIN 47. — Le sérum de ce lapin ne présente aucun pouvoir agglutinant normal, à 1/1 vis-à-vis du bacille typhique et du *b. lactis aerogenes*. Le 21 novembre 1899, inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture en bouillon de 24 heures de bacille typhique.

Taux du pouvoir agglutinant : le 26 novembre, 1/100 vis-à-vis du bacille typhique, nul à 1/1 vis-à-vis du *b. lactis aerogenes* : le 27, toujours nul vis-à-vis de ce microbe, actif à 1/500 vis-à-vis du bacille typhique. Ce même jour, inoculation intraveineuse de 1 c. c. de culture en bouillon de *b. lactis aerogenes*. Le 28, pouvoir agglutinant faible à 1/500 vis-à-vis du bacille typhique, nul vis-à-vis du b. lactis aerogenes. Le 30, le sérum agglutine le bacille typhique à 1/500, le *b. lactis aerogenes* à 1/10; le 1er décembre, il les agglutine respectivement à 1/100 et 1/30, le 7 à 1/4.000 et 1/30 : le 21 le pouvoir agglutinant est de 1/300 vis-à-vis du bacille typhique, il n'a pas été recherché sur le *b. lactis aerogenes*.

L'inoculation du *b. lactis aerogenes* pendant la période d'ascension de

l'agglutinine typhique a donc amené un arrêt et même une baisse légère dans la courbe de cette agglutinine, puis la courbe s'est relevée et a repris sa marche régulière. Le développement de l'agglutinine du bacille n'a pas atteint un chiffre élevé.

III[e] Expérience. — Inoculation simultanée de cultures de microbes agglutinogènes.

Lapin 47. — Ce lapin, précédemment inoculé, le 23 décembre 1903, avec un 1/2 c. c. de bacille dysentérique (Shiga) porté 1/2 heure à 65°, a présenté vis-à-vis de ce microbe un pouvoir agglutinant de 1/40 le 20 décembre, 1/20 le 1er janvier.

Le 7 janvier, on lui inocule sous la peau 1 c. c. d'un mélange à parties égales de culture de bacille typhique vivante, et de culture de bacille dysentérique portée une 1/2 heure à 60°.

Taux du pouvoir agglutinant, le 13 janvier (6e jour) 1/50 pour le bacille typhique, 1/30 pour le bacille dysentérique; le 19 janvier (12e jour) respectivement vis-à-vis de ces deux microbes 1/50 et 1/20; le 28 janvier (21e jour) 1/80 et 1/5.

Le développement des deux agglutinines a donc été très médiocre.

Lapin 15. — Pouvoir agglutinant normal nul à 1/1 vis-à-vis du *b. lactis aerogenes*, faible à 1/10 vis-à-vis du bacille typhique et du bactérium coli. Le 1er décembre 1899, inoculation intraveineuse de 1 c. c. d'un mélange à parties égales de cultures de 24 heures en bouillon des trois microbes suivants : bacille typhique, bactérium coli, *b. lactis aerogenes*.

Taux du pouvoir agglutinant : 3, 4 et 5 décembre, nul à 1/1 pour les trois microbes, 7 décembre nul pour le *b. lactis aerogenes*, net à 1/10 pour le bactérium coli, faible à cette dilution pour le bacille typhique; le 8 décembre nul pour le *b. lactis aerogenes*, faible à 1/10 pour les deux autres microbes; le 12 décembre, faible à 1/10 pour le bacille typhique, nul à cette dilution pour les deux autres microbes; le 22 décembre, net à 1/20 pour le bacille typhique, nul à 1/20 pour le bacille typhique, nul à 1/10 pour les deux autres.

Le développement des agglutinines s'est donc fait d'une façon très faible et très irrégulière pour le bacille typhique et le bactérium coli; il n'y a pas eu production d'agglutinine active vis-à-vis du *b. lactis aerogenes*.

Il n'est pas naturellement possible de tirer de conclusions générales de ces expériences trop peu nombreuses.

*
* *

Courbe de l'agglutinine chez les animaux soumis a l'inoculation simultanée de cultures typhiques et de sérums agglutinants d'origine diverse, mis en contact ou non avec les cultures

Dans un travail antérieur [1], nous avons montré que l'inocu-

1. Nicolle et M. Trenel, *Société de Biologie*, 22 décembre 1900.

lation dans les veines du lapin, d'un mélange à peu près exactement compensé d'une culture morte de bacille typhique et de sérum agglutinant, déterminait chez lui la production de l'agglutinine spécifique, et que la courbe de cette substance était sensiblement identique à celle que provoque chez le même animal l'inoculation d'une quantité égale de la même culture non additionnée de sérum. Une semblable constatation avait été déjà faite par M. Rehns [1]. Notre conclusion, comme la sienne, était qu'on ne peut voir dans le phénomène de l'agglutination une neutralisation véritable de la substance agglutinable par l'agglutinine et que, s'il y a combinaison chimique entre les deux substances, cette combinaison est singulièrement instable, puisque l'inoculation aux animaux suffit à la détruire. Nous nous basions sur cette constatation pour conclure que l'agglutination est plus voisine des phénomènes physiques que des actions chimiques.

Nous plaçant aujourd'hui à un tout autre point de vue, celui de l'influence du sérum agglutinant sur la courbe de l'agglutinine, nous apportons un certain nombre d'expériences qui, d'autre part, viennent à l'appui de nos conclusions antérieures.

Dans ces expériences, nous nous sommes servis de cultures vivantes, et le sérum, lorsqu'il a été mélangé aux cultures, y a toujours été ajouté en excès.

Nous avons fait usage de deux sérums d'origine différente. L'un provenait d'un lapin soumis à une seule inoculation de cultures typhiques, l'autre d'un âne immunisé par des injections répétées d'une toxine typhique soluble très active et de corps microbiens. Tantôt les deux substances ont été inoculées (dans les veines ou sous la peau) après un contact plus ou moins long; tantôt l'inoculation en a été faite simultanément en des régions éloignées.

Nous exposerons d'abord les résultats très différents que nous ont donnés nos expériences. Nous rechercherons ensuite et nous trouverons facilement les raisons de ces différences.

I. — Inoculation d'un mélange de sérum agglutinant de lapin et de cultures typhiques.

Le sérum de lapin dont nous avons fait usage était actif à 1/1500.

1. Rehns, *Société de Biologie*, 8 décembre 1900.

LAPIN 30. — Le 20 avril 1903, ce lapin reçoit sous la peau 1 c. c. d'un mélange à parties égales d'une culture typhique de 24 heures en bouillon et du sérum actif à 1/1,500. Le sérum a donc été ajouté en excès. Le mélange a été laissé en contact pendant une heure.

Taux du pouvoir agglutinant : avant l'inoculation 0 à 1/1 ; le 22 avril 1/20, le 24 : 1/40, le 30 : 1/800.

Le développement de l'agglutinine s'est donc fait normalement.

Le résultat de cette expérience est à rapprocher de ceux relatés dans le travail que nous avons publié avec M. Trenel. Que le sérum soit en excès ou non, que les cultures soient vivantes ou mortes, le développement du pouvoir agglutinant se fait, dans ces conditions, de la même manière.

LAPIN 65. — Le 4 avril 1903, ce lapin est inoculé sous la peau avec 1 c. c. d'un mélange à parties égales d'une culture en bouillon de 24 heures de bacille typhique et du même sérum agglutinant. Le contact a été maintenu pendant 1 heure 1/2.

Taux du pouvoir agglutinant : avant l'inoculation 1/1 ; le 5 avril 1/5, le 6 avril 1/10, le 8 avril 1/200. Par suite d'un accident, l'expérience n'a pu être poussée plus loin : le résultat est cependant comparable à celui obtenu avec le lapin 30.

II. — INOCULATION SIMULTANÉE ET DANS DES RÉGIONS DIFFÉRENTES D'UN SÉRUM AGGLUTINANT D'ANE ET DE CULTURES TYPHIQUES.

LAPIN 80. — Le 1er avril 1903, on inocule simultanément à ce lapin sous la peau de régions différentes, d'une part 1/2 c. c. de cultures vivantes de bacille typhique en bouillon de 24 heures, d'autre part 1/2 c. c. de notre sérum d'âne. Ce sérum est actif à 1/4000.

Taux du pouvoir agglutinant : avant l'inoculation, faible à 1/1, le 2 avril : 1/1 ; le 3 : 1/5 ; le 4 : 1/10 ; le 5 : 1/20 ; le 6 : 1/200 ; le 8 : 1/2000.

L'inoculation du sérum agglutinant d'âne pratiquée en même temps que celle de la culture, mais dans une région éloignée, n'a donc modifié en rien la courbe normale de l'agglutinine.

III. — INOCULATION D'UN MÉLANGE DE SÉRUM AGGLUTINANT D'ANE ET DE CULTURES TYPHIQUES.

LAPIN 28. — Ce lapin est inoculé *sous la peau*, le 26 février 1903, avec un mélange de 10 gouttes de culture typhique en bouillon de 24 heures (soit environ 1/3 de c. c.) et de 5 gouttes de notre sérum d'âne actif à 1/4000. Le mélange a été laissé au contact pendant 3/4 d'heure.

Taux du pouvoir agglutinant : avant l'inoculation, faible à 1/1 ; les 1, 4, 5 et 6 mars : 1/1 ; le 8 mars : 1/3, le 10 mars : 1/1.

L'inoculation, sous la peau du lapin, du mélange de culture typhique et sérum agglutinant d'âne (ce dernier en excès) n'a donc été suivie du développement d'aucun pouvoir agglutinant.

LAPIN 83. — Ce lapin est inoculé *sous la peau* le 13 avril 1903, avec un c. c. d'un mélange de deux parties de culture typhique en bouillon de 24 heures et du même sérum d'âne, après un contact d'une heure.

Taux du pouvoir agglutinant : avant l'inoculation faible, à 1/1 ; le 14 avril même constatation, le 16 : 1/5, les 22, 24 et 30 : 1/1.

Donc, même résultat que dans l'expérience précédente, pratiquée dans des conditions identiques.

LAPIN 49. — Inoculé *dans les veines* le 12 mars 1903 avec un c. c. d'un mélange de deux parties de culture typhique en bouillon de 24 heures et d'une partie du même sérum d'âne, après une heure de contact.

Taux du pouvoir agglutinant : avant l'inoculation, faible à 1/1 ; le 14 mars : 1/1, le 15 : 1/1, les 16, 17, 19 et 20 faible à 1/5.

L'inoculation intraveineuse du mélange n'a donc pas été plus suivie de l'apparition de l'agglutinine que ne l'avait été l'inoculation sous-cutanée.

Le même lapin inoculé à nouveau le 23 mars avec un c. c. d'une culture de bacille typhique a donné le 30 mars un sérum actif à 1/1500. L'injection du mélange cultures sérum, inactive par elle-même, est donc sans influence sur le développement ultérieur de l'agglutinine.

REMARQUES A PROPOS DE CES EXPÉRIENCES ET CONCLUSIONS

Il ressort des expériences que nous venons de relater que :

1° L'inoculation au lapin d'un mélange de sérum agglutinant de lapin et de cultures typhiques donne lieu à la production dans son sérum d'un pouvoir agglutinant, dont la courbe est sensiblement identique à celles que produit l'inoculation de cultures seules.

2° L'inoculation simultanée, mais en des régions différentes, de notre sérum agglutinant d'âne hyperimmunisé et de cultures typhiques est suivie de l'apparition d'une courbe analogue.

3° Au contraire, l'inoculation, après contact prolongé, d'un mélange de sérum agglutinant du même âne et de cultures typhiques n'est suivie du développement d'aucun pouvoir agglutinant.

Nous devons nous demander à quoi tiennent ces différences et pourquoi, dans ces expériences, le sérum d'âne se comporte

autrement que le sérum de lapin, lorsqu'on le mélange aux cultures typhiques.

La solution du problème nous sera donnée par la simple observation des phénomènes qui se passent *in vitro*.

L'addition du sérum de lapin (actif à 1/1500), à la dose massive employée dans nos expériences, provoque l'agglutination immédiate des cultures auxquelles on l'ajoute. Il y a production d'amas volumineux qui, rapidement, se déposent au fond du tube. Ces amas ne subissent ultérieurement aucune modification; ils sont sensiblement aussi volumineux après 1 ou 2 heures de contact qu'à la première minute. Au microscope, mêmes constatations qu'à l'œil nu.

Le sérum d'âne employé par nous se comporte d'une façon tout à fait différente. Ajouté *in vitro*, à dose également massive à la culture, il détermine une agglutination immédiate, peut-être encore plus brutale. Les amas sont plus gros et la clarification du liquide plus rapide, mais ces amas ne conservent pas longtemps leur volume. Si l'on examine de temps en temps le mélange, on remarque que peu à peu le phénomène perd de son intensité, les amas deviennent de moins en moins gros, pour atteindre, au bout d'une heure, des dimensions qui les rendent à peine perceptibles à l'œil nu. Au microscope, on peut suivre cette fonte progressive des amas, et l'on s'aperçoit qu'elle s'accompagne d'une dimunition du nombre des microbes. Ceux-ci, immobilisés et souvent altérés dans leur forme (sans cependant présenter le type de granules), semblent se dissoudre peu à peu dans le liquide qui les baigne.

A l'action agglutinante seule, manifeste dans le mélange culture et sérum d'âne, s'est donc ajoutée dans ce cas une véritable action dissolvante, bactériolytique.

C'est à la présence de cette bactériolysine qu'est due, on ne peut en douter, l'absence de production de l'agglutinine chez les animaux auxquels on inocule un mélange de ce sérum et de cultures. Les choses se passent de même, nous l'avons vu, que l'inoculation du mélange soit faite sous la peau ou dans les veines. Lorsque les deux produits sont inoculés simultanément, mais en des régions éloignées, le contact ne se réalisant pas, la production de l'agglutinine se fait normalement.

Nous avons recherché quelle était l'action de la chaleur sur

la substance bactériolytique du sérum d'âne immunisé. Nous avons constaté qu'elle n'était pas détruite par un chauffage d'une demi-heure à 60°. Cette bactériolysine se présente donc comme une substance spéciale, différente des cytases qui sont, on le sait, détruites à 60°. Nous n'avons pas eu le loisir de pousser plus loin cette étude; nous nous réservons d'y revenir un jour.

L'action très spéciale du sérum de cet âne sur la bacille typhique nous paraît également intéressante au point de la théorie même du phénomène de l'agglutination. Ce que la bactériolysine détruit, c'est d'abord et avant tout la membrane d'enveloppe des microbes. Au moment où l'on pratique l'inoculation aux animaux, on distingue encore dans le mélange un très grand nombre de bacilles typhiques réunis en amas de volume médiocre. Si l'inoculation de ces microbes ne donne lieu plus tard à l'apparition d'aucun pouvoir agglutinant, c'est que le sérum a détruit ou neutralisé ce qui dans ces microbes constitue la substance agglutinogène. L'agglutinine seule n'a pas, nous l'avons vu, ce pouvoir.

Il est donc naturel de penser que le siège de cette substance agglutinogène est à la surface même du microbe, puisque c'est sur la membrane d'enveloppe que porte d'abord l'action du sérum. C'est l'opinion, qu'avec M. Malvoz et ses élèves, nous avons toujours défendue.

Un autre point intéressant, quoique d'un ordre différent, est à noter à propos de ces expériences. On sait, et nous avons déjà insisté sur ce fait[1], que l'inoculation d'une culture typhique au lapin, s'accompagne pendant quelques jours d'une modification dans la coagulabilité du sang de cet animal. A partir du 4e jour qui suit l'injection, jusqu'au 8e ou 10e jour, on constate généralement que le sang retiré des veines se coagule avec la plus grande rapidité; la conséquence de ce fait est de rendre souvent difficile la prise de quelques gouttes de sang au niveau de la veine de l'oreille, surtout aux environs du 5e et du 6e jour. Le même phénomène se passe si, au lieu du bacille typhique, on inocule au lapin un échantillon de bactérium coli ou de bacille de la psittacose.

Chez les animaux qui reçoivent simultanément, en des

1. C. Nicolle et M. Trenel, Ces *Annales*, 1902, page 581.

régions différentes ou en mélange, des cultures typhiques et du sérum d'âne ou de lapins immunisés, la coagulabilité du sang n'est nullement modifiée. Il en est de même chez les animaux soumis ultérieurement à une inoculation de cultures typhiques, lorsqu'on pratique une nouvelle injection de ces cultures.

* * *

ACTION *in vitro* DE LA CHALEUR SUR UN MÉLANGE DE CULTURES TYPHIQUES ET DE SÉRUM AGGLUTINANT

Nous venons de voir que l'inoculation au lapin d'un mélange de sérum agglutinant et de culture, provoque chez cet animal le développement d'une agglutinine dont la courbe est sensiblement parallèle à celle qui suit l'inoculation d'une même quantité de cultures seules. Les choses se passent de la même manière que le mélange soit exactement compensé, ou que le sérum agglutinant ait été employé en excès. La seule condition nécessaire pour la production de ce phénomène, c'est que le sérum actif ne présente pas à côté de l'agglutinine une substance bactériolytique, analogue à celle dont nous avons constaté la présence dans le sérum d'âne.

Il était intéressant, après avoir établi que le mélange cultures et sérum se comportait *in vivo*, comme si les deux produits ne contractaient entre eux aucune combinaison, de rechercher quelle serait *in vitro* l'action de la chaleur sur un mélange semblable. C'est ce que nous avons fait dans les expériences qui suivent :

Nous nous sommes servis d'un sérum de lapin (lapin 78), dont une goutte agglutine *in vitro* vingt gouttes de cultures typhiques dans un délai de 5 minutes. Le mélange réalisé dans ces proportions est laissé au contact pendant un quart d'heure, puis porté à des températures variées.

1° à 75°. — A cette température on observe une rapide désagglutination, qui devient complète en 5 minutes. Au bout de ce temps, on ne voit plus trace d'amas, et le mélange présente à l'œil l'aspect trouble ordinaire des cultures typhiques. Au microscope, les microbes se montrent isolés, non altérés mais immobiles.

Le mélange, retiré de l'étuve à 75° et replacé à la température ordinaire du laboratoire, ne présente aucune réagglutination même au bout de 48 heures. Un réensemencement montre que les bacilles typhiques ont été tués.

Il n'y a là rien de bien surprenant, car nous savons d'une part que l'agglutinine est détruite à 75°, d'autre part, que les cultures typhiques portées à cette température perdent en partie leur agglutinabilité.

2° *à* 65°. — A cette température, la désagglutination ne débute qu'après une heure. Au bout de 2 heures, elle est complète à l'œil nu. Le microscope montre encore cependant de très petits amas microbiens constitués par la réunion de trois ou quatre individus. Tous les microbes sont immobiles et morts, ainsi que les montrent les réensemencements qui sont pratiqués.

Le mélange retiré de l'étuve à 65° et laissé à la température ordinaire ne présente aucune réagglutination même après 48 heures.

3° *à* 55°. — A cette température, la désagglutination est à peine esquissée au bout de 2 heures. La culture retirée de l'étuve à 55° reprend en une heure presque exactement l'aspect qu'elle présentait avant d'y avoir été portée. Au microscope, les microbes sont immobiles.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec M. Trenel.

En résumé, la chaleur agit sur le mélange agglutinine-culture absolument de la même manière que si chacune de ses parties constituantes avait été soumise isolément à son action. Qu'elle se fixe simplement sur les corps microbiens ou qu'elle se combine avec leur substance, l'agglutinine conserve donc une même sensibilité à l'action de la chaleur.

*
* *

PRODUCTION *in vitro* D'UNE AGGLUTININE SPÉCIFIQUE PAR UN ÉCHANTILLON DE BACILLE TYPHIQUE

Dans un travail antérieur [1], nous avons montré que le bacille typhique cultivé dans un bouillon additionné de sérum agglutinant prend, au bout d'un certain nombre de passages, la propriété de donner, lorsqu'on le reporte dans du bouillon ordinaire, des cultures dont l'aspect rappelle celui des bacilles typhiques traités par l'addition de sérum spécifique. Cette propriété se conserve pendant un certain nombre de passages. Nous avions attribué ce phénomène à la production par le bacille typhique d'une substance analogue à l'agglutinine des sérums, et nous lui avions donné le nom d'*agglutinine spontanée*. M. Malvoz [2] a montré l'existence d'une agglutinine analogue dans les cultures du bacille du charbon (1° vaccin charbonneux).

Nous avons isolé de la rate d'un enfant mort de fièvre typhoïde un échantillon de bacille typhique qui produit normalement en culture une agglutinine spécifique.

Il s'agit d'un échantillon isolé en même temps que plusieurs autres en janvier 1897. Cet échantillon parfaitement agglutinable fut à cette époque

1. C. Nicolle. *Société de biologie*, 12 novembre 1898.
2. Malvoz. Ces *Annales*, 25 août 1899.

enfermé dans une pipette. Le 7 octobre 1899, la pipette est ouverte, son contenu ensemencé en bouillon ordinaire et le tube de bouillon porté à l'étuve à 35°.

Au bout de 48 heures, la culture, lente à se développer, se présente sous l'aspect de grains déposés au fond du tube ou sur ses parois, le bouillon est parfaitement clair. L'agitation mêle les grains au liquide et l'aspect à l'œil nu est exactement celui d'une culture agglutinée. Une agitation répétée diminue le volume des amas sans les faire disparaître cependant; au repos, la clarification se produit très vite.

Repiquée en bouillon, la culture y conserve le même aspect. L'addition d'un sérum agglutinant très actif ne la modifie nullement. Cependant, au bout de deux passages, les amas spontanés deviennent plus petits et surtout plus facilement dissociables par l'agitation; en même temps, la sensibilité vis-à-vis du sérum reparaît, puis augmente. Au bout d'une dizaine de passages, l'aspect agglutiné existe toujours dans la culture au moment où on la retire de l'étuve, mais l'agitation rompt facilement les amas.

Le 12 décembre, nous reportons une trace de la culture du 7 octobre en bouillon, nous mettons à l'étuve et nous filtrons au bout de 48 heures. *Le liquide filtré se montre doué de propriétés agglutinantes spécifiques vis-à-vis du bacille typhique.* L'agglutination se produit en une heure à la proportion d'une partie de filtrat pour cinq de culture, en 3/4 d'heure celle de 2/5 et en un quart d'heure seulement à 1/2. *Cette agglutinine spontanée*, contrairement à la substance analogue des sérums spécifiques, *est complètement détruite en 5 minutes à la température de* 60°. Elle se montre sans action sur le bactérium coli.

Nous avons conservé jusqu'à ce jour quelques pipettes de la culture en bouillon du 7 octobre 1899, et nous avons pu remarquer, en septembre 1903, que l'ensemencement du contenu d'un pipette pratiqué en bouillon ordinaire donnait encore naissance à des cultures présentant l'aspect agglutiné. Celles-ci, examinées au microscope après agitation du tube, montrent des amas nombreux, mais de dimensions médiocres; les microbes qui les constituent comme les microbes isolés présentent une mobilité très faible, ils ne sont pas sensiblement modifiés dans leur forme. La sensibilité au sérum typhique est toujours peu marquée. Nous n'avons pas recherché à nouveau la présence de l'agglutinine dans les cultures filtrées.

La production *in vitro* d'une agglutinine spécifique est un fait intéressant. Nous ne croyons pas cependant qu'on soit autorisé à identifier l'agglutinine des cultures avec celle des sérums. La manière différente dont ces deux substances se comportent vis-à-vis de la chaleur semblerait plutôt indiquer qu'elles sont de nature différente.

*
* *

L'AGGLUTINATION DES CULTURES FILTRÉES

Nous avons dit en commençant cet article que nous n'y expo-

serions que des faits. Nous allons cependant le terminer par l'énoncé d'une hypothèse.

On sait que les théories les plus diverses ont été émises pour expliquer l'agglutination des cultures filtrées par les sérums spécifiques. Pour les uns, ce phénomène est de même ordre que l'agglutination des microbes eux-mêmes; pour les autres, il est de nature différente, et M. Bordet le rapproche des phénomènes de précipitation.

Ce qui distingue le phénomène de Kraus de l'agglutination des microbes vivants ou morts, c'est ce fait, bien mis en évidence par M. Widal, qu'une culture filtrée ne se montre pas plus sensible à l'action d'un sérum fortement actif qu'à celle d'un sérum doué d'un pouvoir agglutinant médiocre. Tandis que, lorsqu'il s'agit de cultures, l'agglutination des microbes peut être obtenue avec une quantité d'autant plus faible de sérum que celui-ci est plus riche en agglutinine (on peut obtenir des sérums actifs à 1/1,000,000), avec les cultures filtrées on n'obtient jamais la formation d'amas à des proportions plus élevées que celles-ci : une partie de sérum pour dix, vingt de culture, très exceptionnellement davantage. Il y a même des filtrats absolument insensibles à l'action des sérums.

Malgré cela, nous pensons que les deux phénomènes sont de même ordre, et que les différences observées ne tiennent qu'au peu de richesse du filtrat en substance agglutinable, cette pauvreté pouvant aller jusqu'à l'absence absolue. Et nous émettons l'hypothèse que cette substance agglutinable peu apte à filtrer est constituée (en ce qui concerne du moins le bacille typhique) par les cils des microbes qui traversent la paroi du filtre à la façon des microbes invisibles. La perméabilité plus ou moins grande des bougies filtrantes expliquerait pourquoi certains filtrats sont réfractaires à l'action des agglutinines, alors que d'autres y sont plus ou moins, quoique toujours faiblement sensibles.

Pour appuyer cette hypothèse, nous avons cherché à mettre en évidence la présence de cils ou débris de cils dans les cultures filtrées de bacille typhique avant ou après addition de sérum. Nous n'y sommes pas parvenus. Les difficultés de cette recherche sont telles que ce résultat négatif ne saurait rien prouver.

Tunis, 1er mars 1904.

Deux cas de guérison de la rage expérimentale

CHEZ LE CHIEN

Par MM.

REMLINGER — Directeur de l'Institut Pasteur de Constantinople.

MUSTAPHA EFFENDI — Préparateur

S'il est une maladie à pronostic fatal, c'est à coup sûr la rage. Il arrive parfois dans les laboratoires qu'un chien auquel on a inoculé du virus rabique par trépanation échappe à l'infection. On le suppose immunisé par une atteinte antérieure, et cette hypothèse a été émise pour la première fois par M. Pasteur. Mais jamais — à notre connaissance tout au moins — cette guérison de la rage n'a été saisie sur le vif de façon irréfutable, et la rage curable n'a pas encore été réalisée expérimentalement. D'où l'intérêt des deux observations suivantes :

Observation I.

Le 7 novembre 1903, un « chien de rue [1] » adulte, jaune-foncé, reçoit dans la veine jugulaire, 5 c. c. d'une émulsion laiteuse de virus fixe, préalablement passée à travers une fine mousseline.

Aucune particularité à noter jusqu'au 21 novembre. Le 21 novembre (14e jour), l'animal présente une inquiétude et une agitation anormales.

Il va et vient dans sa cage, alors que les jours précédents il y demeurait couché. L'appétit qui était excellent est très diminué. Le 22, l'excitation est moindre, mais le train postérieur est parésié; l'inappétence est complète; les yeux sont hagards. Un peu de bave à la bouche.

23 *novembre*. Aggravation. L'animal se tient couché. Si on le force à se lever, il chancelle et tombe aussitôt. Les excitations auditives et tactiles provoquent des crises convulsives. Celles-ci se produisent tout particulièrement lorsque le malade entend les aboiements des chiens voisins.

24 *novembre*. — Toute excitation a disparu. La paralysie du train postérieur est complète. Elle s'est étendue aux membres antérieurs. Toutefois, l'animal n'a pas perdu connaissance. Si on vient à l'appeler, il agite la queue et relève légèrement la tête. Dyspnée.

25 *novembre*. — La paralysie a atteint les muscles du cou. Le malade ne peut plus relever la tête qui reste appliquée contre le sol. Paralysie complète des membres antérieurs et postérieurs. La respiration s'affaiblit. L'ani-

1. On sait que les " chiens de rue " n'ont aucune immunité contre la rage. Le peu d'expansion de la maladie à Constantinople s'explique par la large prédominance de la rage paralytique. (P. Remlinger, la Rareté de la Rage à Constantinople. *Revue d'Hygiène*, avril 1903.)

mal est sans connaissance. Il semble n'avoir plus que quelques heures à vivre.

26 *novembre*. Même état. Les mouvements respiratoires sont si peu intenses, qu'on se demande parfois si le chien n'est pas mort.

27 *novembre*. On est surpris de constater que non seulement le malade est vivant, mais encore qu'une amélioration sensible s'est déclarée dans son état. Il a repris connaissance et se remet à agiter la queue si on vient à l'appeler.

28 *novembre*. Persistance de l'amélioration. L'animal arrrive à relever légèrement la tête. Incapable de se servir de ses pattes, il essaie de se rapprocher de la personne qui l'appelle en se traînant sur le tronc. Il ne peut pas encore manger, mais il essaie de saisir les morceaux de pain mis à sa portée.

29 *novembre*. Amélioration très marquée. Le malade fait quelques mouvements avec ses pattes de devant et de derrière. Quand on l'appelle, il se déplace en rampant sur le tronc. Il mâche et avale les morceaux de pain qu'on lui dépose dans la bouche. Même état le 30.

1er *décembre*. Persistance de l'amélioration. Le chien remue beaucoup mieux les pattes et elles lui servent à se rapprocher de la personne qui l'appelle. Il saisit lui-même les morceaux de pain qu'on met dans sa cage et il les mange sans aucun secours.

2 *décembre*. Comme l'un de nous appelle le chien ponr lui donner du pain, il fait un effort, se dresse sur ses pattes, chancelle, tombe, se relève, chancelle à nouveau et ainsi de suite un certain nombre de fois. Exagération de l'appétit.

3 *décembre*. L'animal est trouvé debout dans sa cage, appuyé contre les barreaux pour ne pas tomber. Si on le force à quitter ce soutien, il chancelle, tombe, mais se relève avec beaucoup plus de facilité que la veille.

Les jours suivants, l'amélioration suit une marche progressive. Pendant quelque temps encore, le train postérieur demeure parésié, la démarche reste titubante, mais du 10 au 15 décembre, l'animal peut être considéré comme complètement guéri. Il ne conserve de sa maladie qu'un degré notable d'amaigrissement et peut-être une diminution de l'acuité visuelle.

Étant donnés les symptômes précédents, étant donné surtout qu'ils ont débuté 14 jours après une inoculation intra-veineuse de virus fixe, il n'est guère possible de les attribuer à une affection autre que la rage. Toutefois, il nous a été impossible de recueillir, pendant la maladie, de la bave, et de l'inoculer à un animal réactif. Nous avons dû, pour appuyer le diagnostic, rechercher si le sérum avait pris des propriétés antirabiques et si l'animal lui-même avait acquis l'immunité.

a) saignée du chien le 14 décembre. Le 16, le sérum est émulsionné avec du virus fixe. Virus et sérum sont laissés 24 heures en présence. Après 24 heures, on lave de façon à

chasser le sérum. On dilue le virus dans un peu d'eau stérilisée, et on l'inocule sous la dure mère de 2 lapins. L'un d'eux a succombé à la rage paralytique le 31 décembre (14e jour), l'autre le 1er janvier (15e jour). Retard sur les témoins : 4 et 5 jours.

b) Le 5 janvier, l'animal est trépané très sévèrement avec du virus fixe. Aucun symptôme morbide. Après deux mois, il est encore vivant et parfaitement portant. Comme témoin, nous avons inoculé, dans la chambre antérieure, un chien qui avait reçu un mois auparavant, dans la jugulaire, 10 c. c. d'émulsion rabique, et n'avait présenté à la suite aucun symptôme morbide. Il mourut de la rage 3 semaines plus tard. Il s'ensuit que le fait de n'avoir pas pris la rage après trépanation, ne doit pas être attribué à l'inoculation du virus dans la jugulaire. Il doit être mis à l'actif de l'affection qui suivit. La nature rabique de celle-ci se trouve ainsi démontrée.

Observation II.

Le 28 novembre 1903, un « chien de rue », adulte, de couleur noire, reçoit, dans la jugulaire, 8 c. c. d'une émulsion laiteuse de virus rabique fixe, soigneusement passée à travers une mousseline, de façon à éviter toute embolie. Aucune particularité à signaler jusqu'au 10 décembre. Le 10 décembre (12e jour) on note de l'inappétence et une légère parésie du train postérieur. Le lendemain, l'anorexie est absolue. La paralysie du train postérieur est beaucoup plus accusée. L'animal se tient couché. Si on le force à se lever, il chancelle aussitôt et tombe. Les membres antérieurs sont indemnes.

12 *décembre.* État stationnaire. Un peu d'excitation dans la soirée.

13 *décembre.* La paralysie est toujours limitée aux membres postérieurs. Elle n'est pas tout à fait complète. Si on excite violemment l'animal avec une tige de fer, il finit par se lever, se tient un instant sur ses pattes, puis chancelle.

14 *décembre.* Même état.

15 *décembre.* Amélioration. Le malade se fait moins prier pour se lever. Il fait quelques pas dans sa cage, mais sa démarche est toujours titubante. L'anorexie persiste.

16 *décembre.* L'appétit est revenu. Les membres postérieurs ne présentent plus qu'une légère parésie.

17 *décembre.* Même état.

18 *décembre.* Le malade peut être considéré comme guéri. Toutefois il est très amaigri, et la vision paraît affaiblie, surtout à droite. Par la suite, ces symptômes se sont peu à peu amendés, et la santé est redevenue parfaite.

Il a été impossible d'obtenir de la bave pour l'inoculer dans les muscles d'un cobaye. Le 26 décembre, l'animal est saigné.

Le 28, émulsion de virus fixe et de sérum. Le 29, trépanation d'un lapin avec le virus lavé et dilué dans de l'eau stérilisée. Le lapin est pris le 11 janvier (13e jour). Il meurt le 13 (15e jour), avec un retard de 5 jours sur le témoin.

Le 5 janvier, trépanation très sévère du chien avec du virus fixe. Aucun symptôme morbide. Après deux mois, l'animal se trouve encore vivant et en excellente santé. Un témoin choisi dans les mêmes conditions que celui de l'expérience précédente a contracté la rage.

On remarquera que chez le 2e chien, la rage a été beaucoup moins accusée que chez le premier. Les deux observations ménagent ainsi une transition graduelle entre les cas où l'inoculation de virus rabique dans la jugulaire n'est suivie d'aucun effet (4 fois sur 10 d'après nos expériences), et ceux où, au contraire, elle entraîne mort à la suite d'une atteinte de la rage classique (4 fois sur 10 également). Une atteinte de rage même atténuée confère l'immunité contre une épreuve aussi sévère que l'inoculation sous-dure-mérienne. Le sérum d'un chien ainsi immunisé possède des propriétés rabicides. Il y a, dans tous ces faits, un argument en faveur de la possibilité de vacciner le chien contre la rage, par voie intra-jugulaire, ainsi que le fait a été réalisé par Krasmitski[1]. Nos observations ne confirment toutefois, que partiellement, les expériences de ce savant, pour qui l'injection intraveineuse de virus rabique est inoffensive, à condition que l'émulsion soit filtrée, diluée et poussée avec lenteur. La différence des résultats obtenus est sans doute en rapport avec le degré de concentration de l'émulsion.

Les faits qui précèdent doivent attirer l'attention sur un deuxième point. Si la rage expérimentale est susceptible de guérison, il en est sans doute de même de la rage clinique. Dans cette hypothèse, une personne mordue par un animal malade, n'est pas sûrement à l'abri du danger si l'animal est encore vivant 8 à à 10 jours après l'accident, ainsi qu'il est classique de l'enseigner. La survie de l'animal mordeur n'est plus un critérium absolu. Un chien peut inoculer une rage mortelle, alors que lui-même aura échappé à la maladie. Un examen vétérinaire très minutieux s'impose par conséquent, et le traitement pastorien devra être suivi dans tous les cas douteux.

1. Krasmitski, Injections intravasculaires de virus rabique, ces *Annales*, juin 1902.

RECHERCHES SUR LES FERMENTS DE MALADIES DES VINS

PAR MM. P. MAZÉ ET P. PACOTTET

Depuis les travaux de Pasteur [1], on sait que les altérations des vins sont dues, le plus souvent, au développement de ferments particuliers qui en modifient la composition et en altèrent le goût.

Dès qu'on a su faire des cultures pures de microbes, divers savants se sont attachés à isoler les ferments de maladie, de façon à les caractériser mieux que n'avait pu le faire Pasteur, dont le travail a aujourd'hui 40 ans [2].

MM. Gayon et Dubourg [3] ont isolé des vins mannités, en 1894, un ferment spécial, le ferment mannitique, dont ils ont fait une étude complète.

M. Laborde [4] est parvenu à transporter le ferment de la tourne d'un vin malade dans un vin sain; il a en outre isolé sur plaques de gélatine un grand nombre d'espèces bactériennes dont quelques-unes lui ont permis de reproduire la maladie dans des vins stérilisés.

Parmi les produits de fermentation qu'il a trouvés dans ses cultures, il a signalé la mannite et l'acide lactique.

MM. Bordas, Joulin et Rackowski [5] avaient également isolé, avant M. Laborde, des vins amers et tournés, des ferments variés qui poussent sur tous les milieux ordinaires; ils signalent la présence de l'acide lactique parmi les produits des fermentations.

Dès 1890, Kramer [6] avait caractérisé la mannite dans les vins gras; il y a trouvé aussi de l'acide lactique; parmi les produits gazeux figurent le gaz carbonique et l'hydrogène. Mach et

1. PASTEUR, *Etudes sur le vin*, Paris, 1872.
2. PASTEUR. *Comptes rendus*, t. LVIII, janvier 1864.
3. Ces *Annales*, 1894 et 1901.
4. *C. r.*, 1898, t. CXXVI, p. 1223, 1898. — *Revue de Vit.*, 1901. — *C. r.*, t. CXXXVIII, p. 228.
5. *C. r.*, 1898, t. CXXVI, p. 598, 1050 et 1443.
6. *Weinbau u. Weinhaudel*, p. 121, 1890. — *Die Bak. u. ihr. Bezieh. zur Landwirts*, 1892.

Portele[1] trouvaient, en 1889, de l'acide lactique dans un vin du Tyrol.

On considère aujourd'hui, d'ailleurs, l'acide lactique comme un produit constant et normal du vin. Cette opinion est peut-être exagérée.

Dès l'année 1900, nous avons commencé l'étude des ferments que nous avons pu isoler des vins malades. Déjà, en 1901, M. Duclaux, qui a bien voulu examiner nos cultures, n'a pas hésité à affirmer que nous avions isolé un ferment de la tourne et un ferment de la graisse[2].

Nous nous proposons, dans ce mémoire, de donner un résumé des résultats que nous avons obtenus; on verra par la suite que nous laissons bien des questions sans réponse; nous n'avons pas pu reproduire les caractères objectifs de l'amertume; mais cela ne prouve pas encore que nos ferments soient différents de ceux qu'a rencontrés Pasteur; des essais ultérieurs établiront leur identité ou permettront de les différencier.

Nous nous contenterons donc de les décrire du point de vue morphologique et physiologique, et nous les appellerons, pour abréger, par les noms des maladies d'où ils tirent leur origine; mais lorsque nous parlons des ferments de l'amer, il ne faut accorder à cette appellation qu'un sens restreint, indiquant seulement qu'ils ont été isolés de vins caractérisés comme vins amers, en raison de leur saveur, de leur aspect, et des caractères microscopiques des ferments qu'ils renferment.

MÉTHODE D'ISOLEMENT

Nous nous sommes adressés de préférence aux vins âgés, ayant plusieurs années de conservation en bouteille. Ces vins ne renferment pas de levures ou de spores de champignons vivants; ils sont dépourvus également de germes de bactéries banales que les vendanges apportent dans les cuves, et que l'on retrouve facilement dans les vins jeunes; ils laissent complètement stériles tous les milieux ordinaires dans lesquels on en introduit quelques c. c., quelles que soient les réactions de ces milieux et leurs qualités nutritives, qu'ils soient placés à l'abri de l'air ou exposés librement à son contact.

1. *Landwirts Versuchsst*, t. XXVII, p. 305, 1890.
2. *Traité de microbiologie*, t. IV, p. 628, 1901.

Ces constatations étant faites, il est tout indiqué cependant de recourir aux méthodes des cultures anaérobies; les vins vieux sont en effet complètement dépourvus d'oxygène, et les ferments qui s'y développent se passent certainement de son intervention. Le choix de la nature du milieu présente quelques difficultés; nous avons essayé, sans grande conviction, tous ceux qui sont d'un usage courant dans les laboratoires; il est en effet puéril de penser à priori que leur emploi puisse conduire à un résultat positif, car il n'est pas douteux qu'ils n'aient déjà été mis à l'épreuve par beaucoup de chercheurs.

Si on se laisse guider par la composition du vin, on est porté à accorder la préférence à des milieux d'origine végétale; le bouillon de haricot convient très bien aux microorganismes qui se développent de préférence dans les infusions végétales. C'est lui qui nous a donné les meilleurs résultats.

On ensemence donc environ 1 c. c. à 2 c. c., du dépôt qui se forme au fond des bouteilles, dans une pipette Roux, renfermant de 15 à 20 c. c. de bouillon de haricot à 3 0/0 de saccharose, neutre ou faiblement acide (0,2 à 0, 3 0/0 d'acide tartrique); on en purge l'air et on ferme à la lampe.

Après plusieurs semaines et même plusieurs mois de séjour à la température de 30°, on observe la formation d'un dépôt blanchâtre au-dessus de la masse colorée produite par la semence. L'examen de ce dépôt au microscope montre qu'il est formé invariablement de chaînettes à éléments ovoïdes (ferment de la graisse), et de bâtonnets et filaments allongés, si l'on est parti d'un vin amer ou tourné.

Si on reporte ce dépôt dans un milieu neuf en se plaçant dans les mêmes conditions, on constate que la prolifération devient de plus en plus active; à la suite de quelques passages, on observe même une production de mousse favorisée par le vide.

Les cultures réussissent très bien en tubes ouverts à condition d'ensemencer largement; le développement est rapide, il se manifeste au bout de 3-4 jours, et on peut le considérer comme terminé au bout de 3 semaines à 30°.

Les cultures en tube ouverts en plein développement nous ont servi à faire des isolements; ceux-ci réussissent très bien dans le même bouillon solidifié par de la gélose, à condition

d'ensemencer dans la masse à la température de 40° à 45°, pendant que la gélose est encore liquide ; si la gélose est inclinée, on voit les colonies apparaître à partir du 4e-6e jour dans les régions profondes ; de là elles gagnent peu à peu les régions moins épaisses et le voisinage de la surface, où elles restent toujours plus petites.

Nous avons ainsi obtenu :

4 bacilles isolés des vins amers ;

4 bacilles isolés des vins tournés ;

2 ferments mannitiques, identiques à celui de M. Gayon, retirés de vins altérés récoltés dans le Caucase ;

1 coccus à grains inégaux, retiré des vins du Caucase et isolé également du vin de Champagne ;

3 ferments en chaînettes, retirés, 2 des vins blancs filants et 1 de vins tournés ou amers.

CARACTÈRES DES MICROBES

Tous ces ferments possèdent un certain nombre de réactions communes, ils prennent le Gram lorsqu'ils sont vivants, ne donnent jamais de spores, ne résistent pas à une exposition de 10 minutes à la température de 65° ; ils se développent très mal dans la gélatine qu'ils ne liquéfient pas ; ils poussent de préférence dans l'intérieur de la gélose ; le ferment mannitique, le ferment de la graisse et le coccus du vin de Champagne peuvent cependant être isolés en surface, après un certain nombre de passages en tubes ouverts.

L'air gêne leur développement ; il faut toujours ensemencer largement en tubes ouverts ; dans une atmosphère confinée, l'air à la pression de 40 cm. de mercure, amène un retard de 15 jours dans des cultures faites dans 1,200 c. c. de bouillon en ballons de 3 litres, si on les compare à celles qui sont réalisées dans le vide. L'oxygène n'est pas absorbé sensiblement ; tous ces ferments peuvent donc se passer de l'intervention de l'oxygène ; ce sont des ferments anaérobies.

Ils ne se développent ni dans l'eau de levure sucrée, ni dans le bouillon Liebig, ni dans le bouillon de viande sucrés, le ferment mannitique mis à part, bien entendu. On pourrait très probablement les y acclimater.

Ils ne se multiplient pas beaucoup dans le lait en tube ouvert ;

le ferment mannitique et un échantillon de ferment de tourne l'ont cependant coagulé au bout de 1 mois à 30°.

COCCUS DES VINS DE CHAMPAGNE

Ce microbe se présente au microscope en grains sphériques isolés ou groupés par deux, trois ou quatre, très inégaux comme diamètre (Pl. II, fig. 1).

Il forme des colonies sphériques, petites, dans la masse de la gélose, à contour bien délimité quand elles sont jeunes, présentant au contraire des diverticules denses et courts quand elles sont âgées, leur couleur vire au café au lait en vieillissant; ceci est d'ailleurs un caractère commun à tous les ferments que nous avons isolés.

En milieu liquide, il se produit un louche très persistant qui se dépose finalement sur les parois des vases où il forme un enduit très adhérent.

Les transformations chimiques qu'il produit dans le bouillon de haricot à 5 p. 100 de saccharose sont très limitées; il donne naissance à de l'acide acétique en petite quantité; une culture faite dans 1,200 c. c. de bouillon à l'abri de l'air à 30° a fourni 48 c. c. d'acide carbonique au bout de 1 mois; il est plutôt nuisible par le louche et le dépôt qu'il forme que par les altérations qu'il provoque dans le vin; nous ne donnerons pas d'autres renseignements sur ce microbe; nous pouvons cependant affirmer qu'il est beaucoup plus répandu qu'on ne l'admet généralement; il passe souvent inaperçu, en raison de l'irrégularité de ses éléments dans un dépôt où d'autres espèces prédominent.

FERMENT DE LA GRAISSE

Le ferment de la *Graisse* ou des *vins filants* forme d'énormes chaînes dans les milieux liquides (fig. 3 et 4); il s'est toujours montré le même partout où nous l'avons rencontré, et peu de vins malades en sont exempts; parmi les échantillons de vins tournés ou amers que nous avons examinés, un seul vin tourné en était dépourvu; il doit jouer un grand rôle dans la maladie de l'amertume comme nous le verrons plus loin: ses éléments

1, KRAMER (*loc. cit.*) l'a rencontré sous cette forme très probablement. (*Bac. viscosus vini.*)

ne sont pas sphériques comme on peut s'en convaincre; ils s'allongent de plus en plus en vieillissant, en même temps que les chaînes se disloquent ; il est alors nettement bacillaire ; dans les vins malades il peut passer inaperçu parce qu'il se rencontre le plus souvent sous cette forme ; Pasteur l'a dessiné sous sa forme caractéristique, à côté de gros bâtonnets du ferment de l'amertume.

Quand on ensemence un dépôt de vin malade où le microscope ne le décèle pas, c'est cependant lui qui pousse toujours le premier dans les milieux dont nous nous sommes servis. Ce résultat permet d'affirmer que nos ferments sont différents de ceux que la plupart des auteurs ont obtenus. De tous les ferments que nous avons isolés, c'est lui le plus rustique après le ferment mannitique.

Ses colonies sont caractéristiques dans la profondeur de la gélose; elles revêtent l'apparence de petites lentilles ovoïdes très aplaties à contours parfaitement limités. Quand elles sont rares, elles deviennent énormes et émettent des segments toujours aplatis et bien délimités.

En milieu liquide il produit un trouble intense et assez tenace; il se dépose en une masse cohérente et visqueuse difficile à disloquer; lorsqu'on laisse les cultures dans une immobilité complète, le liquide devient huileux; il dégage beaucoup de CO^2 et produit de l'alcool; il contribue donc à produire la maladie connue sous le nom de pousse. Lorsqu'on brise la pointe des pipettes Roux, on observe la production de bulles de gaz, qui montent lentement à la surface en raison de la viscosité du milieu.

L'ensemble de ces caractères démontre donc nettement que le microbe que nous avons isolé est bien identique à celui qu'on rencontre dans les vins.

FERMENT DES VINS TOURNÉS

Les colonies qui se développent dans la masse de la gélose sont translucides, à contours très diffus; elles ressemblent, à un faible grossissement, à des colonies de bactéridie charbonneuse; en vieillissant elles deviennent plus compactes, mais conservent toujours un contours effiloché : lorsqu'elles sont très clairsemées, elles grossissent beaucoup et poussent des diver-

ticules formant le plus souvent trois ailettes se coupant suivant une même intersection, en formant des angles de 120° environ. Ce caractère est commun au ferment de l'amertume et au ferment mannitique. Le nombre des lobes augmente lorsque les colonies atteignent un volume très grand.

En bouillon, les cultures reproduisent exactement l'aspect des dépôts qui se forment dans les bouteilles; si la semence est faible, le liquide ne se trouble jamais; les parois des vases se tapissent d'une couche feutrée peu adhérente, présentant de nombreux flocons sphériques très faciles à mettre en suspension. La culture est formée de bâtonnets entrelacés avec de longs filaments sinueux (fig. 5); ceux-ci sont beaucoup plus nombreux dans les cultures anaérobies, surtout quand les cultures sont âgées.

FERMENT DE L'AMERTUME

Les cultures de ce microbe ne se distinguent de celles du ferment de la tourne par aucun détail; tout au plus peut-on observer quelquefois, en milieu liquide, et en tubes ouverts, une plus grande tendance à la segmentation (fig. 6). On verra plus loin qu'on ne peut pas les distinguer non plus par les caractères physiologiques.

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES DIVERS FERMENTS

On n'a pas pu réussir, jusqu'à présent du moins, à établir, au point de vue physiologique, une distinction quelconque, entre les ferments de la graisse, de la tourne et de l'amertume.

Tous se comportent de la même façon vis-à-vis du saccharose, du glucose, du lévulose ou du sucre interverti introduits dans le bouillon de haricot, et en cela, ils se confondent également avec le ferment mannitique.

Les produits principaux auxquels ils donnent naissance sont : du CO^2 pur, comme produit gazeux; de l'alcool éthylique, de l'acide acétique, seul représentant des acides volatils, de l'acide lactique comme acide fixe et peut-être des traces d'acide succinique ; de la mannite en présence de lévulose libre, peut-être de glycérine, en milieux aérobies.

Ces corps ont été déterminés qualitativement sur tous nos

échantillons de ferments. Nous donnons dans le tableau I les résultats quantitatifs obtenus dans des cultures faites en présence de lévulose ou de glucose à 1,8 0/0, à 30°, en ballons de 250 c. c. fermés seulement avec du coton. Le bouillon de haricot employé était neutre.

TABLEAU I.

	GRAISSE		TOURNE		AMER	
	Glucose.	Lévulose.	Glucose.	Lévulose.	Glucose.	Lévulose.
Alcool p. 1000 en poids.	1,72	0,20	1,54	0,22	1,40	0,25
Acide acétique p. 1000..	1,22	2,45	0,76	2,11	0,45	1,71
— lactique — ..	1,35	1,32	2,42	2,16	2,84	2,51
Mannite — ..	0,00	11,49	0,00	6,12	0,00	4,94
Sucre restant — ..	12,01	1,10	11,64	0,08	12,20	7,30
Extrait sec — ..	29,69	32,10	30,54	32,76	31,90	33,29
Durée de l'expérience...	16 j.	16 j.	16 j.	16 j.	15 j.	15 j.

Les chiffres de ce tableau montrent que la qualité des produits est partout la même; on ne constate que des variations de quantité. L'alcool est peu abondant dans les cultures faites en présence de lévulose; par contre, l'acide acétique augmente en raison de la production de mannite [1]; l'acide lactique reste à peu près constant en présence des deux sucres, pour un même microbe.

Nous avous cultivé d'autre part les ferments de l'amertume et de la tourne, dans du moût de pinot, obtenu par macération du raisin à la température de 60°, afin de dissoudre la matière colorante; on a ensemencé une levure de Bourgogne, après, en même temps, ou avant l'introduction des ferments. Les cultures ont été réalisées à la température de 30° dans des ballons de 250 c. c. remplis jusqu'à la base du col.

Le moût, stérilisé à la température de 120°, renfermait 17^{gr},45 0/0 de sucre, et possédait une acidité de 5,987, évaluée en acide tartrique.

Les conditions imposées aux cultures les plaçaient au bout de quelques jours, sinon de quelques heures, à l'abri de l'oxygène, car les ballons étaient munis de bouchons en caoutchouc, qui portaient des tubes de dégagement dont l'extrémité plongeait sous le mercure.

1. P. MAZÉ et A. PERRIER. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVII, p. 587.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II.

	Levure seule.	Levure et Tourne 1, ensemencés ensemble.	Amer 1 et Levure 12 jours après.	Amer 2 et Levure 12 jours après.	Levure seule.	Levure et Tourne 2, 6 jours après.	Amer 1 seul.	Amer 2 seul.
	1	2	3	4	5	6	7	8
Alcool p. 1000 en V.	101,3	58,9	70,7	45	86	100	2,01	1,42
Acidité volatile, $C^2H^4O^2$..........	0,57	7,23	6,02	7	0,51	1,03	6,73	8,86
Acidité fixe, produite, en acide lactique........	»	7,02	6,09	9,75	»	0,41	6,05	6,43
Acidité fixe totale, en acide tartrique............	6,05	11,84	11,06	14,11	5,96	6,33	11,02	11,34
Mannite p. 1000..	0,00	31,7	31	40,92	0,00	0,65	28,60	42,10
Sucre restant, — .	»	»	24,27	39,47	36	21,83	120,93	111,45
Extrait sec, — .	39,26	96,27	83,12	102,6	67,11	37,63	199	187,22
Durée des cultures.	47 j.	47 j.	51 j.	51 j.	92 j.	106 j.	92 j.	92 j.

On voit que le moût de raisin convient très bien à tous ces ferments; lorsqu'ils sont introduits dans les cultures en même temps que la levure, ils se développent aussi bien que lorsqu'ils sont ensemencés seuls; la levure ne les gêne pas ; par contre ils gênent la levure, en acidifiant très fortement les milieux, surtout en produisant de l'acide acétique; l'influence de cette action se traduit dans l'aspect de la levure : ses éléments s'allongent et se déforment beaucoup; si les ferments de maladie sont introduits 6 jours après la levure, ils se développent encore, et communiquent au produit les caractères d'un vin tourné, mais la liqueur ne renferme comme acides volatils que de l'acide acétique (col. 1).

Mais pour obtenir ces résultats, il faut ensemencer largement des ferments jeunes (environ 2 c. c. du dépôt formé dans un tube, renfermant 12 à 15 c. c. de bouillon).

Lorsqu'on emprunte la semence à des cultures âgées, le ferment n'a pas le temps de se développer avant la fin de la fermentation produite par la levure, et le vin reste inaltéré. Une culture âgée renferme en effet peu de germes vivants ; on a vérifié ce fait à diverses reprises par des isolements directs ; il en est d'ailleurs de même dans les vins altérés ; le dépôt est relativement pauvre en éléments jeunes, et c'est pour cela qu'il est si difficile d'obtenir des cultures en partant de ces dépôts.

Si l'on considère la transformation que ces ferments réalisent dans le moût de raisin, on voit qu'ils produisent des quantités relativement élevées d'acide lactique et de mannite ; ces deux composés ont été déjà signalés dans les vins malades ou dans les milieux artificiels avec lesquels on avait cultivé les ferments de maladie ; Pasteur a retiré d'un vin tourné plusieurs décigrammes d'acide lactique [1]; mais ni l'un ni l'autre n'ont éte trouvés jusqu'ici dans les vins amers ; leur abondance dans les milieux artificiels, opposée à leur rareté dans les vins, ne saurait cependant nous surprendre ; le vin, malgré la fréquence de ses altérations, reste malgré tout un milieu médiocre où les transformations restent limitées en raison même de l'absence ou de la rareté des composés qui les favorisent.

L'acide lactique provient des sucres, la mannite du lévulose, or, les sucres sont toujours peu abondants dans les vins, et il suffit qu'ils dépassent 2 ou 3 grammes par litre pour que les ferments de maladie s'y implantent et s'y développent.

Malgré la lenteur avec laquelle ils se multiplient, ils atteignent néanmoins un poids élevé, que l'on peut évaluer sans exagération à 0,5 — 1 gr. par litre ; c'est donc 1 gr. de sucre, au bas mot, qui disparaît à l'état de substance vivante ; le reste donne de l'acide lactique, de la mannite, de l'alcool, du CO^2 et de l'acide acétique ; la part qui revient à chacun est donc très faible, si bien que, lorsqu'on n'est pas prévenu, l'acide lactique et la mannite peuvent passer inaperçus ; rien ne prouve du reste que l'acide lactique, en particulier, ne soit pas détruit peu à peu dans les cours de la maladie ; on sait en effet que la glycérine et l'acide tartrique sont quelquefois détruits ; l'acide lactique n'est pas plus réfractaire qne ces deux composés aux actions microbiennes ; il peut donc être détruit comme eux.

Tout autres sont les conditions qu'on réalise dans les milieux artificiels ; le sucre est abondant et la température favorable ; les ferments se développent mieux et plus vite ; les transformations ne sont limitées que par l'accumulation des produits de fermentation, et c'est toujours l'acidité qui arrête les cultures ; on trouve donc facilement tous les composés qui se sont formés aux dépens des sucres.

1. *Le Vin*, page 56. — Balard a retiré directement de l'acide lactique de plusieurs espèces de vins, et notamment de vins qui n'avaient jamais été réputés altérés. Cité par Pasteur, p. 55.

Malgré la vraisemblance de cette interprétation, il faut reconnaître que la présence de l'acide lactique et de la mannite dans les cultures artificielles du ferment de l'amer, et l'absence d'acide propionique dans celles du ferment de la tourne, semblent indiquer que nous n'avons pas isolé de vins amers ou tournés les espèces réellement actives.

Il s'agit donc de se demander si les ferments que nous venons d'étudier sommairement sont capables de se développer dans les vins. Le meilleur moyen de l'établir, c'est assurément de les y cultiver; mais il n'est pas toujours facile de se procurer du vin dans un état convenable pour une pareille démonstration.

A défaut de cette démonstration qui ne saurait tarder, on peut déjà faire remarquer que tous les ferments que nous avons isolés possèdent des propriétés telles qu'aucun des éléments constituants du vin ne saurait empêcher leur développement.

L'acidité est l'agent antiseptique le plus actif du vin ; cette acidité est toujours doublée ou triplée par les ferments de maladie dans le moût de raisin; leur développement sera donc toujours assuré là où il y aura 3 ou 4 0/00 de sucre et de matières azotées.

Si on ajoute à cela que l'isolement des espèces microbiennes présentes dans une maladie donnée conduit toujours à des résultats identiques, du moins si l'on part d'un vin amer, on a quelque raison d'admettre que les ferments que l'on obtient, se confondent avec ceux qui agissent dans les vins.

VINS TOURNÉS ET AMERS

La conclusion qui ressort le plus nettement de l'étude des propriétés physiologiques des ferments que nous avons isolés, c'est qu'ils agissent tous de la même façon sur les sucres ordinaires; le coccus (fig. 1) excepté. Ils semblent avoir les mêmes besoins et partant, sont capables de se développer dans les mêmes milieux; c'est pour cela qu'ils poussent indifféremment dans les vins blancs ou rouges ; l'amer seul semble se localiser dans les vins rouges; on peut donc prévoir qu'ils sont capables de se développer simultanément dans un même vin. Pratiquement, c'est ce qui se produit; l'association de ces espèces dans

les vins altérés est la règle ; la présence d'une espèce unique est une exception qui n'est réellement fréquente que dans les vins blancs filants, ou les vins troubles de Champagne.

Deux vins du Caucase, un rouge et un blanc, nous ont fourni la série complète de nos ferments, celui de l'amer excepté.

La tourne et l'amer sont toujours accompagnés du ferment de la graisse ; mais jusqu'ici nous n'avons rien dit de la part qui revient à ce dernier dans les altérations causées par les associations microbiennes ; notre méthode d'isolement ne permet pas en effet de se faire une idée de l'abondance relative des ferments associés ; le microscope ne fournit pas des indications sûres sur ce point particulier ; le ferment de la graisse se montre en général sous son aspect caractéristique dans les vins filants, parce que cette altération est aussi brusque que passagère ; mais lorsque la maladie affecte un développement lent, comme la tourne et l'amer, le ferment de la graisse se disloque et ses éléments s'allongent beaucoup, un œil prévenu distingue facilement à côté des filaments de tourne et d'amer des bâtonnets beaucoup plus fins groupés en chaînettes de deux ou trois éléments qu'il est impossible d'identifier avec la forme prédominante ; ce sont des ferments de la graisse déjà vieux.

Nous avons eu l'occasion, une seule fois, d'étudier un vin de l'année en voie de tourner. Ce vin avait été mis en bouteille dans le courant de janvier ; vers le milieu du printemps, il a présenté tous les symptômes d'un vin tourné ; la maladie s'est aggravée durant l'été, et au mois de septembre, quelques bouteilles se sont débouchées spontanément.

Au microscope, on constate la présence du ferment de la tourne, qui forme un dépôt très abondant au fond des bouteilles, quoique complètement privé de cellules de levure. L'analyse chimique fournit les renseignements suivants relatifs aux éléments les plus intéressants.

TABLEAU III.

Acidité totale en $C^4H^6O^6$	Par litre.	7,468
Acidité volatile $C^2H^4O^2$	—	1,533
Acidité fixe $C^4H^6O^6$	—	5,551
Acide acétique	—	1,277
Acide propionique	—	0,315

On a pris une goutte du dépôt, et on l'a diluée dans 12 c. c. de bouillon ; avec la dilution, on a ensemencé des tubes de

gélose encore liquide à la température de 40-43°. Des colonies nombreuses se sont développées dans la masse de la gélose; elles étaient dues en grande partie au ferment de la graisse, c'est-à-dire un ferment de tous points identique à ceux des figures 3 et 4; les colonies de tourne étaient bien moins nombreuses.

Si l'on se reporte aux chiffres du tableau I, on voit que le ferment en chaînettes fournit les mêmes produits de transformations que son associé, et contribue pour sa part à donner de l'alcool et du CO^2, des acides volatils qui caractérisent la pousse et la tourne, au même titre que le ferment en bâtonnets de la tourne.

Voilà donc une observation directe qui confirme ce que nous avons annoncé dès le début de ce travail; les maladies des vins sont dues presque toujours à des associations microbiennes; c'est un fait dont il faudra tenir compte lorsqu'on voudra communiquer à des vins sains, des maladies déterminées en partant de cultures pures.

Le ferment en chaînettes est, de toutes les espèces que nous avons isolées, de beaucoup le plus répandu; nous l'avons aussi rencontré, nous le répétons, dans tous les vins amers que nous avons examinés, nous avons même constaté, dans ces derniers, qu'il semble survivre au ferment de l'amer; nous citerons deux observations qui tendent à le démontrer :

Un vin de Bourgogne, reçu au laboratoire au commencement de 1902, est caractérisé à la dégustation comme vin tourné ; le microscope confirme ce diagnostic; à l'isolement, ce vin donne deux ferments ; le ferment en bâtonnets et le ferment en chaînettes[1].

On bouche une bouteille laissée intacte avec un bouchon en caoutchouc, et on l'abandonne pendant un an à la température de 25°. Au bout de ce temps, on l'examine de nouveau. On constate d'abord une pression assez forte à l'intérieur de la bouteille, le vin est décoloré et possède une saveur amère très prononcée; le dépôt présente la plus belle flore de vin amer que nous ayons rencontrée.

1. Lorsque la maladie de l'amer est à ses débuts, le ferment jeune et libre de tout dépôt inconstant de matière colorante peut être confondu avec celui de la tourne.

Après 6 mois d'un nouveau séjour à la température ordinaire du laboratoire, on voit que les faisceaux de bâtonnets qui caractérisent les vins amers commencent à se dissocier ; par contre, le ferment de la graisse a sensiblement repris, et on trouve les chaînettes typiques que le ferment reproduit exclusivement pendant qu'il est jeune. L'amertume a presque disparu et le bouquet est agréable.

Le tableau IV, colonne Bg, résume la composition de ce vin, en ce qui concerne les éléments intéressants. On remarquera que son titre alcoolique est très élevé, et que par contre, son acidité fixe est faible.

Un autre échantillon de vin de Bordeaux amer, reçu à peu près à la même époque, a été conservé dans les mêmes conditions et pendant le même temps.

Au début, le microscope montre encore le ferment de l'amertume; le vin est très amer et très décoloré.

Au bout d'un an, le dépôt est complètement transformé en une masse de petites spères brunatres, où on ne trouve plus les gros faisceaux enrobés de matière colorante, si nombreux lors de la première observation. Six mois plus tard, les sphérules se sont transformées en une masse de dépôt amorphe, où l'on trouve des bacilles fins assemblés en chaînettes et des ferments jeunes caractéristiques du ferment de la graisse. Le vin est moins amer à la dégustation, et son bouquet n'est pas très altéré.

On avait isolé de ce vin, au moment de sa réception, un bacille qualifié amer 2 dans les tableaux I et II, et un ferment de la graisse, qui est reproduit dans la figure 2.

Ce dernier s'est donc conservé 1 an et 6 mois dans ce vin, à une température relativement élevée, et au bout de ce long intervalle de temps, il se multipliait encore, alors que le ferment de l'amer avait complètement disparu.

L'analyse de ce vin est reproduite dans le tableau IV, colonne Bd.

TABLEAU IV.

		Vin Bg	Vin Bd.	Observations
		—	—	—
Alcool en V. p. 100		11,56	8,97	L'acidité volatile est constituée par du $C^2H^4O^2$ pur dans Bg, mélangé d'une trace d'acide propion. dans Bd.
Acidité volatile en $C^2H^4O^2$	Par litre.	2,01	1,63	
Acidité fixe en $C^4H^6O^6$	—	5,35	5,36	
Substances réductrices en glucose.	—	0,20	traces	
Extrait dans le vin filtré	—	14,06	16,93	
Aldéhydes	—	traces à peine sensibles.	traces	

On voit que l'acidité totale de ces vins est peu élevée : c'est ce qui favorise la durée d'action des ferments de maladie ; de plus, le sucre est très peu abondant et l'extrait également très faible ; ce sont donc des vins très dépouillés, et les ferments qui s'y implantent ne sauraient, en raison de la pénurie des sucres, présenter la rapidité de développement qu'on observe assez souvent dans les vins atteints de pousse ou de tourne ; la rareté de cet aliment peut être invoquée aussi pour expliquer la disparition de la glycérine, observée par M. Duclaux, et peut-être la décomposition de la matière colorante.

La constitution du vin jouerait ainsi un grand rôle dans l'évolution et la spécificité de la maladie ; nous avons dit que les diverses espèces de ferments que nous avons isolés peuvent se développer indifféremment dans un vin susceptible de s'altérer ; l'histoire de ces deux vins amers en est une nouvelle preuve, et on peut alors se demander si, en réalité, ce n'est pas la composition du vin qui détermine le genre de la maladie qu'il est susceptible de présenter sous l'influence d'une invasion microbienne.

CAUSES D'ALTÉRATION DES VINS

On connaît depuis Pasteur les causes qui favorisent le développement des ferments des maladies ; nous n'avons pas d'observations nouvelles à présenter sur cette question. Tout au plus, nos recherches permettent-elles de les mieux cataloguer.

Si l'on veut mettre les vins à l'abri des invasions microbiennes, il faut favoriser autant que possible la disparition des substances qui les provoquent.

En tête de ces substances viennent les sucres et les matières azotées ; comme les vins en renferment toujours, on peut affirmer que, théoriquement, ils ne sont jamais à l'abri des ferments de maladies ; mais, pratiquement, leur prolifération est presque toujours très limitée, et comme les produits qu'ils forment aux dépens des sucres sont à peu près les mêmes que ceux que donne la levure, l'altération ne devient sensible que lorsque ces corps, en particulier les acides, atteignent une proportion élevée ; il faut pour cela que le vin renferme une quantité assez grande de sucres.

Bien des facteurs influent sur le montant des sucres qui échappent à la fermentation ; tous ceux qui tendent à l'exagérer constituent des causes indirectes d'altérations.

En premier lieu, il faut citer les mauvaises fermentations; celles-ci se produisent généralement par les basses températures. Les cuves de dimensions exagérées prolongent également la durée des fermentations, parce que la levure ne peut pas se multiplier aussi activement dans une masse aussi considérable où l'air ne saurait se renouveler une fois qu'il a été absorbé ; on sait que la prolifération de la levure est limitée à l'abri de l'air; le poids de cellules actives n'est pas proportionnel au poids de la vendange, il est surtout en rapport avec la quantité d'air dont dispose la levure; et pour une même quantité d'oxygène absorbé, la fermentation s'achèvera d'autant plus vite que le volume du moût est plus faible.

Le degré de maturité du raisin influe également sur la marche de la fermentation; lorsque la vendange est bien mûre, elle fermente mieux ; le raisin insuffisamment muri est trop riche en acide, et une acidité élevée paralyse l'activité de la levure parce que la zymase se conserve moins bien en milieu acide. Les années de mauvaise maturation sont des années de tourne.

Une circonstance qui aggrave le danger résultant d'une fermentation incomplète, c'est que l'azote qui passe dans le vin varie dans le même sens que le sucre ; si la prolifération de la levure est limitée, il y a moins d'azote entraîné dans la lie ; une fermentation paresseuse retarde le premier soutirage et la levure subit une autophagie avancée ; elle rend donc au vin une partie de l'azote qu'elle avait emprunté au moût.

Le raisin, de son côté, apporte, suivant les circonstances, plus ou moins d'azote dans le vin; en particulier le raisin de vigne mildiewsée est plus riche en azote que celui qui est récolté sur une vigne saine.

Les vins récoltés sur les vignes mildiewsées sont très fragiles[1].

Un mauvais collage laisse de l'azote dans le vin et peut être le point de départ d'une invasion microbienne.

Les différents crus sont naturellement plus ou moins riches en azote; les vins de Bourgogne sont réputés pour leur fragilité; ils sont deux fois plus riches en azote que les vins des autres régions; cette particularité n'est pas sans inconvénient au point de vue de la conservation.

L'acidité, toutes choses égales d'ailleurs, est un obstacle au développement des ferments de maladies. Mais elle ne peut, en aucun cas, mettre les vins à l'abri de toute atteinte, si les autres conditions favorables sont réalisées. Nous avons vu en effet que les levures sont plus sensibles aux acides que les ferments de la tourne, de l'amer ou de la graisse; ceux-ci produisent jusqu'à 1/100 d'acide acétique si le sucre est abondant; pendant que l'acidité totale monte à 2/100; aucune levure ne peut faire fermenter un moût aussi acide, surtout quand l'acide acétique y entre pour la moitié.

C'est dire qu'un moût capable de subir la fermentation alcoolique ne peut pas se défendre par la suite, en raison de sa constitution, contre les ferments de maladies.

Le seul moyen de le mettre à l'abri des altérations qui reconnaissent cette origine, c'est de l'épuiser le plus possible en sucres et en azote; comme il est impossible de l'en priver complètement. il faut considérer le vin le plus sain comme ayant été ou comme étant susceptible de devenir plus un moins malade.

L'alcool aussi peut contribuer a paralyser les microbes, le tanin peut-être; mais ni l'un ni l'autre ne sont évidemment des agents protecteurs absolus; le tanin semble jouer un certain rôle dans la maladie de la graisse, car les vins rouges, où il est très répandu, sont rarement filants, mais cela ne veut pas dire que le ferment ne s'y développe pas.

Il ne faut pas oublier cependant que des doses élevées d'acidité, d'alcool et de tanin donnent de la stabilité au vin, et toutes

1. Manceau, *C. R.*, t. CXXXVII, p. 998.

les causes qui interviennent pour diminuer ces doses, diminuent aussi sa résistance ; les cuves en ciment non affranchies ont l'inconvénient de diminuer l'acidité ; la précipitation de la crême de tartre agit dans le même sens.

Parmi les agents de protection du vin qui interviennent naturellement, quoique n'entrant pas dans sa composition, il faut citer l'oxygène; tous les ferments que nous avions étudiés sont anaérobies ; l'oxygène gêne beaucoup leur développement.

Dans les vins en bouteille, ces ferments ne rencontrent pas d'oxygène ; il faut le regretter car, pour les vins de Bourgogne, par exemple, une petite quantité d'air suffirait souvent pour les protéger contre la maladie de l'amer ; nous pensons même qu'il suffirait quelquefois de placer les bouteilles debout, au lieu de les incliner, pour constater les bons effets de l'oxygène qui diffuse à travers les bouchons.

Babo et Nessler recommandent d'ailleurs d'aérer les vins atteints d'amer, parce que l'aération fait disparaître l'amertume par voix d'oxydation ; à cela, nous ajouterons qu'on arrête en même temps le développement du ferment.

C'est aussi une pratique excellente, dans les pays chauds, que celle qui consiste à faire circuler les moûts en fermentation sur des réfrigérants ; non seulement on régularise la marche du phénomène en modérant la température et en aérant la levure, mais on entrave d'une façon très efficace le développement des ferments de maladie dont les invasions sont si soudaines lorsque la levure est gênée par la température.

RÉSUMÉ

Les vins malades, jeunes ou vieux, sont envahis par un certain nombre d'espèces microbiennes qui sont presque toujours associées.

Les vins tournés renferment quelquefois presque toutes les espèces que nous avons étudiées ; le ferment de l'amertume est toujours accompagné du ferment de la graisse dans les vins que nous avons examinés.

La raison de ces associations se trouve dans ce fait que les propriétés physiologiques de ces ferments sont à peu près identiques ; ils détruisent les sucres ordinaires suivant les mêmes

processus, et les produits de fermentation se forment à peu près dans les mêmes proportions.

Ils peuvent donc se développer dans les mêmes milieux, et comme ils sont plus résistants aux acides que les levures, ils prolifèrent indifféremment dans tous les vins, pourvu qu'ils y trouvent des sucres et des matières azotées.

Nous n'avons pu reproduire ni les caractères objectifs de l'amer, ni observer la destruction de la crème de tartre ou la formation d'acide propionique dans les cultures pures de nos ferments.

Cela tient à ce que nous avons opéré en présence de grandes quantités de sucre, et peut-être aussi à l'emploi d'une espèce pure; les associations sont toutes indiquées par les nombreuses observations que nous avons faites.

Le plus répandu de tous les ferments de maladie est celui de la graisse ; c'est le plus facile à isoler, et comme il n'a jamais été cultivé par les auteurs, nous pensons que les ferments que nous avons retirés des vins vieux atteints de tourne ou d'amer sont différents de ceux qui ont été isolés jusqu'ici.

Les vins pauvres en sucres et en azote peuvent être considérés comme stables vis-à-vis des ferments de maladie ; mais lorsque ces deux substances sont présentes en quantités sensibles, aucun élément constituant du vin ne peut offrir une barrière suffisante au développement des microbes.

LÉGENDE DE LA PLANCHE II

Les photographies reproduites dans la planche ont été faites avec des préparations colorées par la méthode de Gram. Ces préparations ont été obtenues avec les dépôts qui se forment dans les cultures en milieu liquide et en tubes ouverts. Le grossissement (800 D) est le même partout.

Fig. 1. — Coccus isolé des vins du Caucase et des vins de Champagne.

Fig. 2. — Ferment mannitique retiré des vins du Caucase.

Fig. 3. — Ferment de la graisse isolé d'un vin rouge amer ; les éléments ne sont pas sphériques (cultures très jeunes).

Fig. 4. — Ferment de la graisse retiré d'un vin blanc filant. Identique au précédent comme aspect.

Fig. 5. — Ferment de la tourne.

Fig. 6. — Ferment de l'amer.

APPAREIL
POUR L'AGITATION CONTINUE DES CULTURES

LE Dr E. BODIN ET LE Dr E. CASTEX
Professeur à l'École de médecine de Rennes. Professeur à l'École de médecine de Rennes.

L'action de l'agitation continue sur les cultures liquides des bactéries a déjà donné de remarquables résultats, notamment pour la tuberculose; on peut s'en rendre compte par divers travaux, comme ceux d'Arloing, de Courmont et Descos, d'Auclair. Il est donc fort utile de posséder dans un laboratoire de bactériologie un appareil permettant de soumettre les cultures à cette agitation.

Plusieurs instruments destinés à remplir ce but existent actuellement, mais ils offrent l'inconvénient d'être fort dispendieux : tel par exemple celui qu'a proposé récemment M. Courmont[1]; nous avons donc pensé qu'il est intéressant d'indiquer ici un petit appareil d'un prix de revient extrêmement modique et avec lequel il est aisé de soumettre à l'agitation continue les cultures liquides en tubes.

Au laboratoire de bactériologie de l'Université de Rennes, où cet appareil fonctionne depuis plusieurs mois, nous avons grâce à lui obtenu rapidement et entretenu d'une manière constante des cultures de tuberculose parfaitement homogènes, pouvant être utilisées pour le séro-diagnostic ou pour toute autre expérience.

Il se compose (fig. 1, plan A et coupe B) d'une plate-forme *a* sur laquelle se placent les tubes à agiter, au nombre de douze, Cette plate-forme peut tourner autour d'un axe horizontal *bb'* et reçoit un mouvement alternatif au moyen d'un galet *c*, qui roule sur une came elliptique et excentrée *d*, mue par un arbre *e* avec une poulie *f*.

L'axe de rotation de la plate-forme est constitué par deux vis à bois à tête ronde, vissées dans la plate-forme sur le pro-

1. P. Courmont, Agitateur électrique pour obtenir et entretenir des cultures liquides homogènes, *Journ. de physiol. et de pathol. générale*, t. V, nº 3, 15 mai 1903, p. 558.

longement l'une de l'autre. Elles tournent dans deux supports *gg'* fixés à la tablette *h*. Il est bon d'interposer, entre la plate-

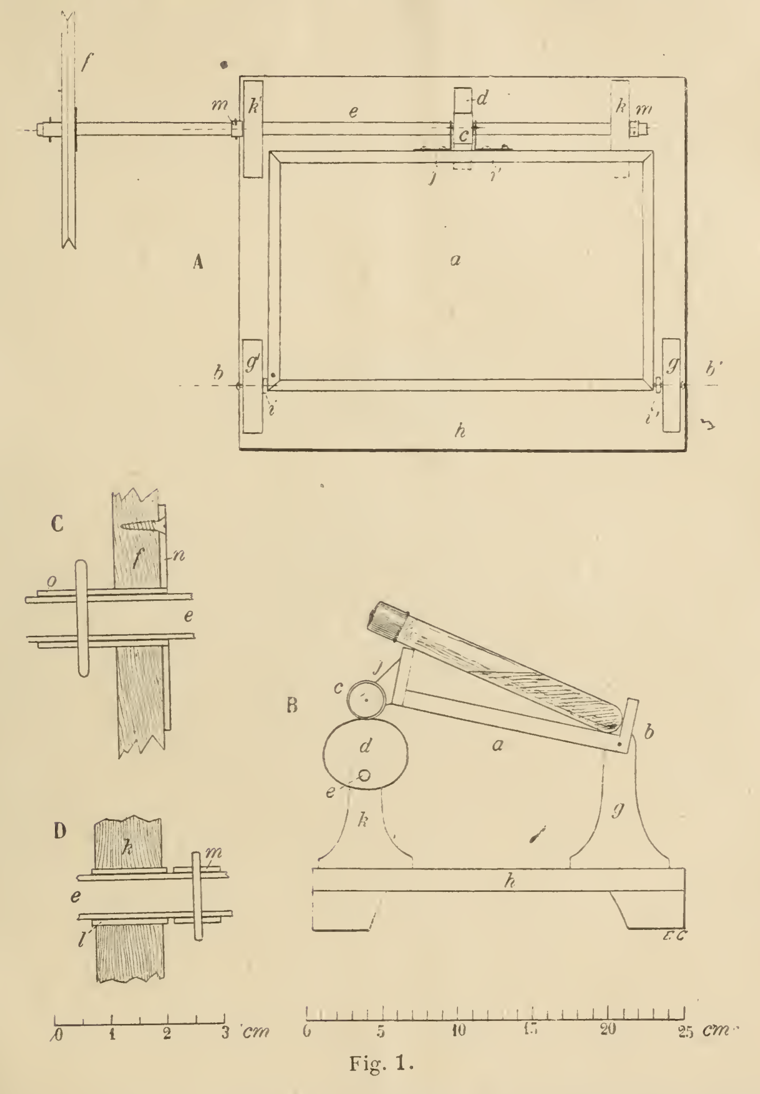


Fig. 1.

forme et les supports, deux rondelles *ii'* pour diminuer le frottement de ces pièces.

Le galet *c*, en bois ou en métal, garni de caoutchouc, tourne entre deux cornières *jj'*, en cuivre de 1 millimètre d'épaisseur.

L'arbre *e* de la came est un tube de cuivre ou laiton de 8 mil-

limètres de diamètre extérieur et de 1 millimètre d'épaisseur.

La came en bois peut être simplement goupillée sur le tube, la goupille affleurant la surface de la came. L'arbre tourne dans deux supports en bois *kk'* ; pour amoindrir le frottement qui, cuivre sur bois, serait assez grand, le plus simple est de garnir le trou de chaque support d'un bout de tube de cuivre *l* (D) de diamètre intérieur convenable. Deux bouts de ce même tube, *m* et *m'* (A et D), goupillés sur l'arbre *e*, avec un jeu suffisant, empêchent les mouvements de latéralité de l'arbre.

La poulie en bois *f* est vissée sur une rondelle *n* (C) soudée à un bout *o* du tube qui sert pour les pièces *l*, *m*, *m'*. Une goupille fixe le tube *o* à l'arbre.

Les échelles donnent les dimensions exactes de cet agitateur. Il peut se placer dans l'étuve du docteur Roux, modèle n° 2 de Wiesnegg, qui n'a besoin d'aucune modification; l'arbre *e* sort par un des trous d'aération et la poulie, placée à l'extérieur, permet d'entraîner l'agitateur par un moteur quelconque. Nous nous servons personnellement d'une petite turbine à eau de Rabe, fournie par la maison Cogit; à la vitesse convenable, la dépense d'eau est de 400 litres environ à l'heure (pression de l'eau au laboratoire, 45 m.). Étant donné le faible rendement de ces petites turbines, un moteur électrique de 2 à 3 kilogrammètres serait certainement suffisant pour le fonctionnement de l'appareil.

L'inclinaison de la plate-forme supportant les tubes est calculée de telle sorte que le liquide contenu dans ces tubes (remplis jusqu'à 1/3 environ de leur hauteur) ne puisse venir au contact du bouchon de ouate. Quand l'appareil fonctionne, le liquide est animé d'un mouvement de va-et-vient dont l'amplitude est suffisante pour brasser toute la masse et que l'on peut rendre plus ou moins rapide en réglant la vitesse de l'appareil.

Une remarque doit être faite relativement à l'agitation des cultures déjà bien développées : si l'agitation est intermittente, après les périodes de repos les grumeaux de la culture se déposent au fond du tube, et, comme c'est la partie du vase où le liquide est le moins agité, certains de ces grumeaux peuvent rester adhérents aux parois lorsque l'on fait à nouveau fonctionner l'appareil. Pour parer à cet inconvénient, il suffit d'agiter vivement les tubes à la main pour bien décoller les grumeaux avant la mise en marche.

DISPOSITIF POUR STÉRILISER LE CATGUT A L'AUTOCLAVE

Par M. TRIOLLET

Il est bien démontré que la stérilisation du catgut à l'autoclave est la seule qui offre les garanties bactériologiques indispensables. Mais le catgut ne doit pas subir à chaud le contact de la vapeur d'eau qui le gélatinise et le rend friable. Aussi, comme l'a démontré le Dr Répin [1], faut-il opérer en milieu anhydre. Mais l'alcool à 100°, dont on se sert ordinairement pour cette

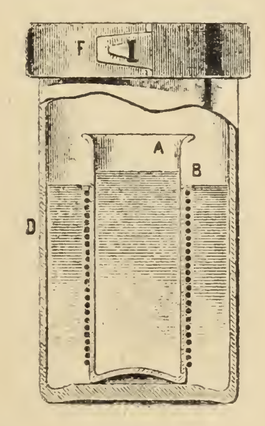


Fig. 1.

stérilisation, s'hydrate aisément, d'où la fragilité trop fréquente du catgut stérilisé en milieu alcoolique.

Il est préférable de substituer de l'acétone, qu'on obtient plus facilement anhydre, et qui conserve mieux, par conséquent, la solidité du catgut.

Toutefois, s'il est utile d'avoir un catgut stérile et solide, il est nécessaire qu'il soit *souple*. Or, la souplesse ne peut s'obtenir qu'en présence d'eau. Cette eau étant nuisible *pendant* la stérilisation, mais indispensable *après*, il fallait trouver le moyen de l'ajouter au catgut, stérilisé en milieu anhydre, *sans ouvrir le flacon* M. J'ai résolu la difficulté en faisant usage du dispositif suivant: on enroule le catgut autour d'un petit flacon —

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894, vol. VIII, p. 20.

bobine A — fermé d'un bout seulement, et contenant la quantité d'eau exactement utile pour la grosseur du catgut à assouplir. On place cette bobine, ainsi préparée, dans un flacon D, renfermant 10 c. c. d'acétone, prenant soin que les deux liquides ne se mélangent pas. On ferme alors hermétiquement le flacon D au moyen d'une bague métallique sertie autour du col, puis on le porte à l'autoclave, où il est soumis à une température de 120° pendant 40 minutes.

L'expérience apprend que, dans ces conditions de temps et de chaleur, l'acétone passe franchement dans l'eau du flacon-bobine (13 0/0); mais la réciproque, c'est-à-dire le passage de l'eau dans l'acétone du grand vase, n'est vraie que pour une quantité insignifiante (0 gr, 10 pour les 10 c. c. d'acétone).

De sorte que, en faisant usage de ce dispositif, la stérilisation s'effectue comme si l'eau n'existait pas dans le flacon. Le catgut conserve donc toute sa solidité ; mais il est rigide, comme il l'est toujours en stérilisation anhydre. Pour l'assouplir, il suffit de renverser le flacon après refroidissement. Les liquides se mélangent et le travail d'assouplissement commence aussitôt. Il dure de quelques heures à quelques jours, suivant la grosseur du fil.

ÉTUDES D'HYDROGRAPHIE SOUTERRAINE

(*Fin.* Voir p. 121.)

Par M. E. Duclaux.

XII

CONCLUSIONS

L'étude que nous venons de faire est, en gros, l'étude d'un département au point de vue des relations entre son hydrographie souterraine et sa géologie. Mais ce n'est pas à ce point de vue qu'elle a été entreprise; elle visait à saisir comment se présente, dans un cas particulier, le programme très général, et toujours difficile, du choix d'une eau potable pour les particuliers ou le public. Il n'est personne à qui ce problème ne se soit posé plusieurs fois, à la campagne ou même dans les villes. On le résout en général par la pratique, en allant à la source ou au puits où va tout le monde, mais il y a toujours des cas où on aurait plaisir ou intérêt à être renseigné sur la qualité d'une eau, et où il faut se résigner à l'ignorance dans l'impossibilité de se former un jugement.

Car il n'y a pas à méconnaître que l'hygiène, à mesure qu'elle devient plus impérieuse et parfois menaçante, devient aussi une divinité plus voilée. Ses prêtres l'y aident. Ils ne sont pas en général pour simplifier les choses, et pour faire correspondre à la pratique de l'hygiène une hygiène pratique. Pour le choix d'une eau potable en particulier, ils ont été un peu extravagants. Dès qu'ils ont eu la notion du microbe, ils n'ont eu rien de plus pressé que de faire d'une numération de germes le contrôle hygiénique d'une eau. Malheur aux communes qui ont eu à ce moment leurs canalisations à faire et de nouvelles sources à capter! Les Conseils d'hygiène se sont montrés sévères, et il n'y avait pas à lutter contre un bulletin d'analyse venant d'un laboratoire dit de bactériologie. Les *Annales* ont toujours pris la liberté de se moquer respectueusement de ces pratiques, de quelque nom qu'elles aient été recommandées.

Il a fallu un peu plus de réserve vis-à-vis d'une autre pratique qui est venue après, et qui consistait à juger de la valeur d'une

eau, non pas d'après le nombre de ses germes, mais d'après celui de ses germes dangereux. Une eau potable devait, par exemple, être injectée sans trouble dans un lapin ou un cobaye. On a dû attendre que cette exigence ait paru impraticable, et que, pour simplifier, ceux qui en étaient chargés aient dû borner leurs efforts à bien caractériser le *bacillus coli* et le bacille typhique.

Le *bacillus coli* a fini par lasser ses chercheurs. Comme il vient souvent du fumier, et qu'il y a du fumier partout, presque aucune eau n'en est absolument exempte, et on ne le regarde plus que comme une mauvaise note, n'impliquant pas rejet. Pour le bacille typhique, il est surtout dangereux, virulent, lorsqu'il sort d'un intestin humain, et c'est à ce moment-là qu'il faut le surveiller pour l'empêcher de revenir dans les eaux courantes. Heureusement, les typhoïques ne sont pas nombreux, même en temps d'épidémie, et on peut, sans grand effort, se protéger contre eux. C'est même là, une des précautions les plus recommandées et les plus utiles.

La bactériologie a certainement fait beaucoup pour la science, mais elle n'est guère allée plus loin pour l'hygiène, dans laquelle elle était entrée d'une façon si triomphante qu'elle avait fait oublier les services rendus par la modeste chimie. Il n'était plus question que de microbes. Il m'avait paru, il y a une quinzaine d'années, que la chimie restait vraiment trop silencieuse, et qu'elle avait souvent son mot à dire quand il s'agissait des eaux potables ou même des eaux en général. L'hygiéniste est, par essence, l'homme qui amène de l'eau propre, et qui emmène de l'eau sale ; il doit pouvoir répondre à toute question posée dans cet ordre d'idées.

Pour la réponse, il y a place pour le bactériologiste, qui parlait beaucoup, pour le chimiste, qui ne parlait pas assez, puis aussi pour une troisième compétence, celle du géologue, qui parlait peu, parce qu'on ne lui demandait rien, qui parlait assez mal, car, à l'origine, il ne voulait pas connaître le bactériologiste ni le chimiste, mais qui, en somme, parle bien maintenant, et ne demande qu'à apprendre. Bref, on en était arrivé naguère à admettre que toute enquête administrative au sujet d'une eau potable réunirait autour d'elle, dans chaque département, la triple compétence du chimiste, du bactériologiste et du géologue. Je

comptais beaucoup sur le nouveau venu, le géologue, que la force des choses obligeait à prendre le plus souvent hors du service départemental, parmi les auxiliaires du service de la carte géologique de France, et j'avais commencé à travailler pour lui, non pas pour lui donner, bien entendu, une leçon de géologie, qu'il savait mieux que moi, mais pour lui montrer dans un cas particulier quelles étaient les questions à résoudre et comment elles se présentaient, lorsque je vis apparaître la loi sur la Protection de la Santé Publique promulguée le 15 février 1902.

Je ne saurais cacher qu'elle m'a désolé. Je rends volontiers hommage à tous ceux qui se sont dépensés autour d'elle. Je ne dis même pas que l'état actuel de l'opinion publique à l'égard de l'hygiène rendît possible de mieux faire. Mais on peut apprécier l'effort et ne pas applaudir au résultat. Tout mon livre d'*Hygiène sociale* [1] était à l'avance dirigé contre cette loi. Je la considère toujours comme inexécutable, et cette ambition de faire grand, lorsqu'on ne peut pas même être sûr de faire petit, me semble maladive. Mais ce n'est pas une raison pour ne pas continuer à travailler. J'avais commencé, pour donner un peu de compétence à ceux qui n'en avaient pas; la loi nouvelle en a augmenté le nombre dans les Conseils d'hygiène des départements et arrondissements : elle augmente aussi leurs responsabilités; c'est à eux qu'il faut penser, et que s'adressent les résultats du travail précédent.

Ils se résument, en somme, en ceci : on peut se faire assez vite et à peu de frais une idée approximative, mais juste, de la circulation des eaux souterraines, des plans d'eau qu'elles présentent, de leur pente, de leurs chances d'infection, de l'abondance et la de qualité des sources ou des puits par une analyse chimique faite dans des conditions particulières.

Les éléments de cette analyse sont variables et en petit nombre. Dans le Cantal, ça a été du calcaire et du sel marin. Ailleurs, ils pourront être autres. Il faudra dans tous les cas faire plusieurs analyses sur un même point et dans la région, pour pouvoir se faire une idée de l'état moyen et établir les comparaisons nécessaires. C'est parce que, autrefois, les analyses se comptaient par unité qu'il était impossible d'en tirer quelque chose. J'en peux dire autant de la température. C'est parce qu'on se contentait

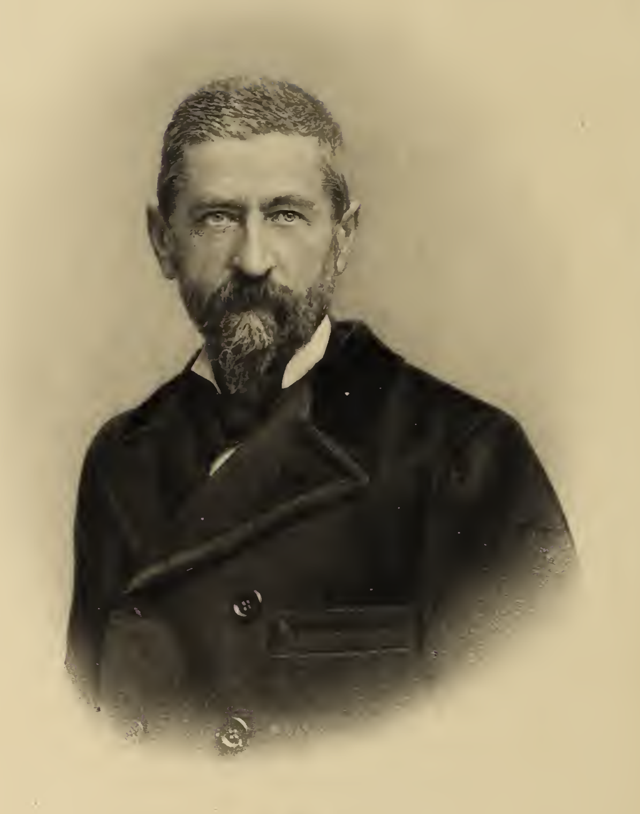
1. *L'Hygiène sociale*. Paris Librairie Felix Alcan, oct. 1901.

de plonger une fois un thermomètre dans l'eau qu'il n'y avait rien à conclure du chiffre obtenu. En somme, ce ne sont pas des éléments nouveaux que j'apporte dans la question; ce sont des moyens nouveaux de tirer parti de ceux que l'on possède.

Pour ne rien compliquer, j'ai laissé de côté tous les renseignements d'ordre bactériologique. Ce n'est pas que je les dédaigne; c'est que je n'ai pas eu le temps. On peut, comme je le montrerai, tirer de leur étude des renseignements utiles. Mais, à moins de circonstances exceptionnelles, il faut bien savoir qu'ils sont de second ordre et qu'une étude préliminaire peut les négliger. Les autres suffisent pour nous donner l'indication des bonnes eaux, ce qui est l'essentiel, et, en les employant, les hommes, comme les cités, s'apercevront qu'il y en a toujours, et que l'hygiène est une amie, au lieu d'être l'ennemie qu'on se représente, bonne surtout quand elle a passé.

Le gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.



EMILE DUCLAUX

1840 – 1904

18me ANNÉE MAI 1904 No 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

L'Institut Pasteur est encore une fois en deuil; Émile Duclaux, son directeur, le fondateur de ces *Annales*, est mort le 3 mai dernier.

En moins d'une année, Nocard et Duclaux nous ont été ravis!

Tous ceux qui ont fréquenté l'Institut Pasteur comprendront notre profond chagrin, car ils connaissent les sentiments qui unissaient les travailleurs de cette maison à son directeur. Ces sentiments étaient ceux de confiance, de respect et d'affection qu'inspire un véritable chef.

Après Pasteur nul ne convenait mieux que Duclaux pour diriger cet Institut, où sont rassemblés de jeunes savants dont il savait respecter l'indépendance, tout en orientant leurs efforts vers un but commun. Son autorité était aimée, car elle tenait non à sa situation mais aux qualités de son esprit et de son cœur. On allait vers lui lorsqu'on se sentait perdu dans les obscurités d'une recherche scientifique, on y allait aussi quand on se sentait atteint par les misères de la vie. La confiance naissait dès l'abord, tant son accueil était cordial, tant le lumineux regard de son œil bleu un peu railleur exprimait de bonté. Duclaux avait bientôt compris ce que vous attendiez de lui; sa lucide intelligence écartait l'obstacle qui vous arrêtait et

son bon cœur trouvait toujours de quoi réconforter. Il ne perdait jamais une occasion d'obliger. En le quittant on se sentait meilleur pour les luttes scientifiques comme pour les luttes morales.

La conversation de Duclaux, simple, imagée, pleine d'idées originales, était charmante; elle était de plus bienfaisante, parce qu'elle laissait transparaître un caractère d'une rare beauté. Aussi, cet homme si jaloux de son indépendance, si respectueux de celle des autres, était-il devenu, sans s'en douter, un directeur de consciences. Aucun de nous, disciples ou amis, n'aurait eu l'esprit tranquille si Duclaux avait désapprouvé quelqu'une de ses actions.

Cette influence, Duclaux la devait à ce que ses actes valaient encore mieux que ses paroles. Lorsqu'il croyait une chose juste, rien ne l'aurait empêché de l'entreprendre. Il allait de l'avant sans forfanterie, sans souci des préjugés à renverser non plus que des coups à recevoir. Il était de ces hommes peu communs qui soutiennent une cause, non pour les avantages qu'elle peut rapporter, mais simplement parce qu'ils la jugent bonne. Duclaux défendait celles qu'il avait adoptées avec la ténacité de sa race auvergnate et aussi avec une force de pensée, une clarté, une allégresse généreuse qui rendaient sa foi communicative. Quant aux attaques contre sa personne, il les supportait avec une imperturbable sérénité; ce savant au corps mince et aux membres frêles possédait le vrai courage, il le possédait au point d'en donner aux autres dans les moments tragiques.

La bonté, le culte désintéressé du juste et du vrai ont été les règles de sa vie privée comme

de sa vie scientifique. C'était un bonheur pour lui que de rencontrer dans un mémoire des faits nouveaux et des expériences bien conduites. Si le travail venait d'un jeune, sa joie était complète. Il le signalait dans ses articles des *Annales*, qui étaient des merveilles d'exposition et de critique. Si bien que l'auteur trouvait souvent dans les analyses de Duclaux plus qu'il n'avait mis lui-même dans l'original.

Pour faire valoir les travaux d'un débutant, Duclaux n'hésitait pas devant la tâche ingrate de retoucher le manuscrit, de l'élaguer, parfois même de le récrire pour que ressortît mieux le point intéressant qui n'était pas toujours celui que l'auteur avait cru.

Ses critiques pénétrantes et justes, d'un tour original et piquant, ne blessaient jamais; elles remettaient dans le droit chemin et gardaient de la vanité.

Des correspondants de tous les pays recherchaient les conseils de Duclaux qui passait une bonne part de son temps à converser avec eux. Il excellait à découvrir les jeunes talents et à leur donner conscience d'eux-mêmes. Il était vraiment un accoucheur d'esprits, car il savait amener au jour ce qu'il y avait de bon dans les conceptions les plus confuses.

Duclaux était avant tout un indépendant. Il estimait les doctrines scientifiques à leur fécondité sans les croire définitives, et pensait volontiers que les périodes fructueuses de la science sont celles où les dogmes sont ébranlés.

Son savoir était véritablement encyclopédique ; Duclaux avait étudié à fond les sciences mathématiques et physiques et était apte à comprendre toutes les autres. Aussi était-il capable

d'écrire un livre comme son *Traité de microbiologie* et de traiter avec compétence des sujets de physique et des sujets de médecine. Les lecteurs de ces *Annales* en ont eu maintes fois la preuve dans les revues critiques où il mettait une question au point avec une précision et une aisance admirables. Ce n'est pas à eux qu'il est besoin de rappeler les qualités de Duclaux écrivain. Aucun savant de son temps n'a mieux écrit que lui, aucun n'a mieux employé son talent.

Duclaux a été un professeur incomparable. Sa facilité de parole n'a jamais servi à masquer les difficultés d'un sujet; il allait au fond des choses sans fatiguer l'attention parce qu'avec lui tout devenait facile à comprendre. Ses leçons ont déterminé plus d'une vocation et provoqué de nombreux travaux. Il semait des idées et se réjouissait de les voir lever sur le terrain d'autrui.

Les regrets qu'inspire la perte d'un tel homme ne s'éteindront qu'avec ceux qui l'ont connu. Mais l'estime et l'admiration pour Duclaux seront durables, car ses ouvrages seront là pour attester qu'il était un homme de science de premier ordre et, ce qui est beaucoup plus rare, un noble caractère[1].

1. Dans le prochain nº de ces *Annales*, les lecteurs trouveront une notice sur les travaux scientifiques de E. Duclaux.

RECHERCHES

Sur le mode d'utilisation du carbone ternaire

PAR LES VÉGÉTAUX ET LES MICROBES

Par P. MAZÉ

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

PREMIERE PARTIE

Dans le cours des trois mémoires que j'ai déjà publiés sur ce sujet, j'ai soulevé quelques questions qui n'ont pas encore reçu de réponse.

Lorsque j'ai affirmé que l'alcool constitue la portion utilisable des sucres, j'ai présenté cette conclusion comme la conséquence logique d'un ensemble de faits suffisamment probants. On peut cependant grouper d'autres preuves autour de cette conclusion; leur nécessité s'impose d'ailleurs, car les faits que j'ai rapportés s'accordent aussi bien avec une autre interprétation.

En supposant que le sucre soit assimilé en nature, on peut admettre que la cellule vivante le transforme de telle façon que la fraction définitivement incorporée corresponde à l'alcool ou à l'aldéhyde, sans que ni l'un ni l'autre ne se forment même à l'état transitoire.

La zymase apparaît en effet comme une diastase de la vie anaérobie; l'exemple de la levure semble le démontrer surabondamment, et si on admet qu'elle se forme dans les cellules qui vivent au large contact de l'air, il faut le prouver. Ce sera là le principal objet de ce mémoire; mais lorsque ce point sera élucidé, on aura en même temps résolu d'autres problèmes, déjà posés aussi dans les mémoires précédents.

J'ai admis que la diminution de la ration d'entretien avec l'âge du mycélium, lorsque l'Eurotiopsis est nourri avec du sucre, est due à la destruction de la zymase [1]; cette destruction

1. Ces *Annales*, 2e Mémoire. p. 368, t. XVI.

n'est pas la conséquence de la mort du mycélium; les échanges gazeux suivent leur cours; mais la cellule âgée est incapable de prendre du carbone au sucre; considérée sous ce point de vue, sa longévité est beaucoup plus grande lorsqu'elle est alimentée avec de l'alcool; non seulement la ration d'entretien ne diminue pas dès les premiers jours, mais elle augmente très sensiblement au contraire; l'augmentation est liée à l'aération, qui devient plus facile et plus complète à mesure que les filaments mycéliens s'épanouissent dans l'air; il suffit de constater que ce facteur ne décroît pas dans l'alimentation alcoolique pour relever la contradiction avec les résultats fournis par les cultures en milieu sucré; cette contradiction a ses causes; j'ai supposé qu'elles mettent en jeu la zymase, il s'agit de le démontrer.

J'aborderai enfin l'étude de l'alimentation anaérobie de la levure qui viendra se présenter tout naturellement à la suite de la première partie du mémoire.

VARIATION DE LA ZYMASE AVEC L'AGE DU MYCÉLIUM[1].

La zymase présente dans un milieu donné se mesure par son action sur les sucres qu'elle dédouble; on connaît aujourd'hui les moyens de l'isoler de la cellule vivante; mais on n'en obtient qu'une fraction assez faible. Pour l'évaluer exactement, on en est encore réduit à faire agir les cellules qui la renferment sur des solutions sucrées. L'alcool produit dans un temps donné et à une température déterminée, par un poids connu substance vivante, mesure la quantité de diastase présente ; l'acide carbonique dégagé donne le même résultat à condition cependant que le gaz formé provienne entièrement du dédoublement du sucre par la zymase. Cette dernière restriction a sa valeur, car il est à peu près certain que les ferments anaérobies et la levure en particulier dégagent du CO^2 indépendamment de celui qui est fourni par la zymase.

Mais l'Eurotiopsis alimenté avec de l'alcool ne dégage pas de quantité sensible de CO^2, lorsqu'il est privé d'air; si le mycélium, placé sur une solution sucrée à l'abri de l'oxygène, donne naissance à du CO^2, il faut l'attribuer exclusivement à l'action de la zymase. L'évaluation de cette diastase par la mesure de

1. Voir *C. R.*, Juil. 1902.

l'acide carbonique dégagé, présente l'avantage de suivre ses variations d'heure en heure ou de jour en jour, pendant longtemps sur le même mycélium. C'est le procédé que j'ai adopté.

Comme appareil je me suis servi du ballon représenté par la fig. 2. Le ballon (fig. 1) reçoit les solutions sucrées dans lesquelles on doit introduire le mycélium d'Eurotiopsis; on stérilise le tout à l'autoclave; on introduit ensuite le voile mycélien tout d'une pièce dans le ballon (fig. 1); on étire aussitôt le col et on soude le tube à dégagement muni de son tube latéral (fig. 2); celui-ci

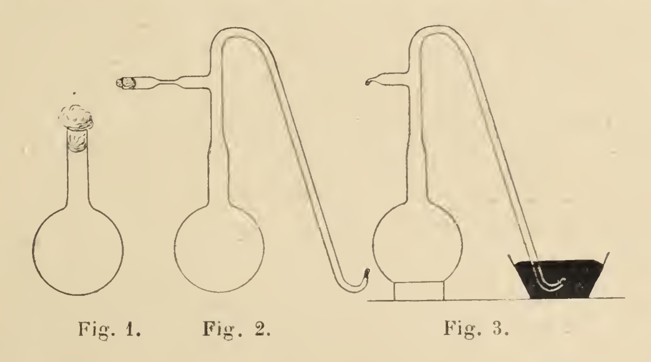


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3.

est adapté immédiatement à une trompe à eau, l'extrémité du tube de dégagement étant fermée ; on chasse l'air de l'atmosphère interne par quelques purges rapides à l'hydrogène, et on ferme à la flamme sur une atmosphère d'hydrogène (fig. 3). On porte alors à l'étuve, on ouvre l'extrémité du tube de dégagement sous le mercure et on recueille le gaz sous le mercure. Le dégagement se manifeste aussitôt; il est lent au début parce que le liquide retient, à l'état dissous, une portion assez importante du gaz qui est d'abord libéré ; mais il atteint son maximum au bout de deux à trois heures, c'est-à-dire au moment où le liquide est saturé et où sa température s'est mise en équilibre avec celle de l'étuve.

Avant d'aborder la détermination des quantités de zymase présentes dans le mycélium, il est indispensable de fixer la concentration des solutions sucrées qui convient le mieux à l'activité de la zymase. C'est, en apparence, une précaution superflue; on sait que les actions diastasiques sont indépendantes de la concentration, à condition qu'elle ne descende pas au-dessous d'une limite donnée; mais cette loi ne se vérifie que pour les diastases

solubles, ou celles qui peuvent être uniformément réparties dans les liquides. Lorsqu'elle est fixée dans la masse mycélienne, la diffusion joue certainement un grand rôle dans les transformations diastasiques. La substance transformée dans l'unité de temps dépend de la quantité qui passe à travers le mycélium et les cloisons cellulaires; l'expérience seule peut renseigner sur ce point. J'ai placé des voiles mycéliens de même âge dans des solutions de sucres de concentration variable, à l'abri de l'air, suivant la méthode que je viens de décrire, et à la température de 30°. Le poids du mycélium est évalué une fois l'expérience terminée; on trouve ainsi des chiffres inférieurs au poids réel, puisque le travail de désassimilation continue à l'abri de l'air; mais les résultats restent comparables. Ils sont réunis dans le tableau I. Les volumes de CO^2 sont ramenés à 0° et à 760.

TABLEAU I.

	5	10	20	30	40	50
Concentration en sucre interverti, p. 100.	5	10	20	30	40	50
CO^2 dégagé, en c. c., dans les 1res 24 h.	99,8	129,2	201,7	207,7	79,7	36,3
— — 2es —	64	85,9	169,3	219,4	118,1	24,7
— — 3es —	59	78,1	142,5	172,8	114,1	23,8
— — 4es —	45,8	67,2	135,8	»	113,7	23,4
— — 5es —	44,8	60,8	133,2	161,4	113,4	19,2
— — 6es —	35,7	58,7	129	156,8	97,6	15,6
Poids du mycélium, en mgr...........	259,4	317	289	307,8	275,3	207,2
Volume de CO^2 maximum dégagé, en c.c., par 1 gr. de mycélium, en 24 h........	384,7	407,5	697,8	680,3	428,9	175,1

On voit que la concentration optimum varie entre 20 et 30 0/0; j'ai adopté la concentration de 20 0/0 dans les essais qui suivent.

Une autre conclusion découle de ces chiffres; c'est que la quantité de CO^2 dégagée décroît du commencement de l'expérience à la fin; la zymase n'augmente pas dans un mycélium jeune à l'abri de l'air; si on fait remarquer en outre que le poids du mycélium décroît également, que les spores ne germent pas même dans les solutions minérales ou organiques complètes, on peut déjà prévoir que la zymase de l'Eurotiopsis ne se forme pas en vie anaérobie.

Elle diminue rapidement aussi, avec l'âge du mycélium. Pour vérifier cette proposition, on fait une série de cultures en fioles coniques de 250 c. c. dans lesquelles on introduit 25 c. c. de liquide Raulin à 10 0/0 de sucre ; on élimine les cultures qui présentent quelque irrégularité dans la formation

du voile; l'âge du mycélium est compté à partir du moment où les premiers filaments aériens émergent à la surface du liquide.

J'ai réuni dans le tableau II les résultats que j'ai obtenus avec des cultures âgées de 24 heures, 48 heures et 4 jours. Ces cultures ont été faites à 30° ; de même que les fermentations à l'abri de l'oxygène. Les volumes de gaz sont ramenés à la pression de 760 et à la température de 0°.

Tableau II.

Age du mycélium	24 h.	48 h.	4 j.
CO^2 dégagé, en c. c., pendant les 1res 24 h.	140	46,4	21,7
— — — 2es —	130,7	90,1	30,2
— — — 3es —	111,2	87,5	33,7
— — — 4es —	104,3	83,3	39
— — — 5es —	101,6	78,8	40,7
— — — 6es —	100,9	74,1	40,8
— — — 7es —	98,4	69,1	42,5
— — — 8es —	94,2	64,7	46,7
— — — 9es —	92,2	62,3	46,7
— — — 10es —	89	59	45,6
— — — 11es —	78,7	55,3	45,6
— — — 12es —	70,5	55,2	44,6
— — — 13es —	63,9	49,8	42,8
— — — 14es —	60,2	48,6	39,6
— — — 15es —	49,5	45,3	38,3
— — — 16es —	36,8	43,2	
— — — 17es —	26,1	37,5	
— — — 18es —	15,1	32,2	
— — — 19es —	6,1		
Poids du mycélium, en mgr	215	347	446,6
Vol. de CO^2 maximum dégagé, en c. c., par 1 gr. de mycélium en 24 h	651	259	104

Ce tableau fournit un certain nombre de renseignements : tout d'abord, on voit que la teneur du mycélium en zymase baisse rapidement avec l'âge, et comme le sucre doit être préalablement dédoublé en alcool et acide carbonique pour être assimilé, le mycélium privé de zymase n'a plus aucune action sur le sucre; ainsi se trouve vérifiée l'interprétation que j'ai donnée de la décroissance de la ration d'entretien, en milieu sucré ; le mycélium alimenté avec de l'alcool se comporte d'une autre façon parce qu'il peut se passer de l'intervention de la zymase.

Si on considère, les volumes de CO_2 recueillis toutes les 24 heures, on voit qu'ils présentent également quelques particularités intéressantes, suivant l'âge des cultures. Un voile de 24 heures dégage le volume de gaz maximum le 1er jour; la destruction de la zymase est même très rapide dès le début, car le volume obtenu ne correspond pas au volume réel

dégagé; la solution sucrée placée en présence d'une atmosphère d'hydrogène se sature peu à peu de CO^2 pendant les premières heures, le volume dégagé devrait donc être augmenté de tout le gaz retenu à l'état dissous. Pour cette raison, le maximum observé le 2e jour avec la culture de 48 heures est fictif à peu près; il ne présente donc aucun intérêt; cette culture se distingue de la précédente par la régularité du dégagement gazeux; la zymase se conserve mieux en apparence; mais on va voir qu'on se trouve ici en présence d'un phénomène de nature assez complexe.

La culture de 4 jours se distingue en effet des deux précédentes par l'allure qu'y affectent les variations de la diastase; le mycélium très pauvre en zymase s'enrichit peu à peu; le CO^2 dégagé croît, et passe vers le 10e jour par un maximum pour décroître ensuite très lentement. Contrairement à toutes les observations que j'ai déjà faites, il s'est donc formé de la zymase en vie anaérobie; on voit ainsi que, dans cette culture, l'acide carbonique dégagé qui mesure la diastase présente, ne fournit en somme que la résultante d'un double phénomène : un phénomène de destruction qui est commun à toutes les cultures et un phénomène de régénération qui ne s'observe qu'avec les cultures âgées; j'emploie à dessein le mot de régénération car il correspond mieux, à mon avis, à la réalité ; dans une culture âgée, il y a de la zymase active, de la zymase inactive et de la zymase détruite; on peut supposer que la destruction de cette diastase est due aux phénomènes d'oxydation qui se produisent normalement dans les cellules aérobies; mais qu'il s'agisse d'une destruction par oxydation ou par tout autre mécanisme chimique, on peut, je dirais même qu'on doit admettre qu'il y a des degrés dans la destruction, et suivant ces degrés, une diastase rendue inactive peut retrouver son activité, ou se régénérer, dans un milieu réducteur, qui est capable de défaire en partie ce qu'un milieu oxydant avait fait.

Dans un mycélium âgé, il y a donc de la zymase qui se régénère lorsqu'on le place à l'abri de l'air parce qu'il renferme de la diastase plus ou moins altérée qui est capable de reprendre en partie son activité dans un milieu réducteur. Dans ces conditions, la quantité de diastase présente, évaluée par le procédé décrit, exprime la résultante de deux actions inverses puisque

celle qui existe déjà se détruit peu à peu. Si la régénération l'emporte sur la destruction, la quantité de diastase évaluée passe par un maximum; c'est ce qu'on a obtenu avec une culture de 4 jours; si les deux phénomènes inverses sont à peu près de même grandeur, la quantité de diastase reste à peu près constante pendant longtemps; la culture de 48 heures en est un



Fig. 4.

exemple; dans ce mycélium il y a aussi en effet de la diatase altérée puisque sa richesse en zymase est inférieure de plus de moitié à celle de la culture de 24 heures. Si le mycélium est très jeune, il a conservé à peu près la totalité de sa diastase, de sorte que les phénomènes de destruction ne sont pas contrebalancés par les phénomènes inverses, et la décroissance rapide des quantités de zymase se manifeste d'un jour à l'autre.

On peut embrasser plus facilement l'ensemble de ces faits si on les représente par des courbes. Les courbes fig. 4 ont été déterminées en portant les temps sur la ligne des abscisses, et les volumes de CO^2 sur l'axe des ordonnées. Elle s'interprètent d'elles-mêmes; nous trouverons plus loin la signification de la courbe M.

ISOLEMENT DE LA ZYMASE DE L'EUROTIOPSIS GAYONI

La zymase de l'Euriotopsis peut être isolée par les mêmes procédés qui servent à extraire celle de la levure; mais comme on a pu le voir, le mycélium est beaucoup moins riche en diastase que la levure; une culture de 24 heures d'Euriotopsis décompose un peu plus de son poids de sucre en 24 heures lorsqu'il est placé à l'abri de l'air; la levure en décompose 10-20 fois son poids dans le même temps. L'opération de l'extraction de la zymase devient donc plus aléatoire avec l'Eurotiopsis.

Il est tout indiqué d'employer des voiles de 24 heures, puisque, à poids égal, ils sont plus riches en zymase que les cultures un peu plus âgées. On prépare donc un certain nombre de cultures sur milieu Raulin à 10 0/0 de sucre; on prend le mycélium et on le presse entre des doubles de buvards de façon à lui enlever son eau d'imbibition; on le plonge alors dans un mélange d'alcool et d'éther secs, composé de 3 parties d'alcool pour 1 d'éther; la zymase conserve d'autant mieux son activité que le mélange éthéro-alcoolique est plus anhydre; pour cette raison, il est utile de presser avec soin le mycélium sans cependant le soumettre à des pressions trop élevées qui élimîneraient par écrasement le contenu des cellules; l'immersion dans l'alcool-éther dure 3 à 4 minutes; ce séjour est suffisant pour tuer le mycélium; quand on le sort du bain, il est translucide et corné comme du parchemin; on le débarrasse de l'alcool-éther par une nouvelle compression dans du buvard, et on achève de le dessécher dans le vide sulfurique pendant 24 h. Il est alors réduit en poudre fine dans un mortier et introduit dans un tube assez large avec une solution de glucose à 30 % à raison de 1 gramme de poudre pour 10 c.c. de solution; la masse ainsi obtenue devient pâteuse au bout de quelques minutes; placée à la température de 36-37°, elle se boursoufle en se creusant d'alvéoles qui laissent passer le CO^2, le dégagement se manifeste au bout de 30 à 45 minutes; pour recueillir le gaz, il suffit de boucher le tube avec un bouchon muni d'un tube de dégagement capillaire, pour réduire autant que possible le volume de l'appareil.

Le dégagement ne dure pas longtemps; il se ralentit assez brusquement, à cette température, au bout de la cinquième heure; je ne sais pas à quoi attribuer cette brusque disparition

de la zymase, car le milieu n'est que faiblement acide au moment où le dégagement s'est arrêté; peut-être faut-il la rattacher, à l'exemple de Buchner pour la zymase de la levure, à une digestion protéolytique qui serait bien plus rapide chez l'Eurotiopsis; la difficulté de préparer de grandes quantités de poudre ou de suc mycéliens ne m'a pas permis d'approfondir ce phénomène qui s'observe également d'une façon identique avec le suc.

Voici les volumes de CO^2 que j'ai recueillis dans quelques essais; les chiffres sont légèrement inférieurs à la réalité parce que je n'ai pas extrait le gaz retenu dans la solution.

TABLEAU III.

Nos d'ordre.	Poids de matière.	Volume de CO^2 dégagé en 5 h. à 37°.
—	—	—
	gr.	c c.
1	2	21,9
2	1,384	16,4
3	2	4,5
4	2 (24 h. à l'abri de l'air).	1,8

Tous ces essais ont été faits sur des voiles de 24 heures tués en pleine vie aérobie, ce qui est le meilleur moyen d'établir l'origine aérobie de la zymase de l'Eurotiopsis. Si on opère de la même façon sur des voiles de même âge, mais préalablement privés d'air pendant 24-48 heures dans le récipient de culture même, on trouve toujours des chiffres de CO^2 inférieurs aux précédents; il n'en saurait d'ailleurs être autrement, étant donnés les résultats que j'ai déjà exposés tableaux I et II.

L'extraction du suc par la presse hydraulique fournit aussi un liquide diastasifère actif; mais il faut préparer un grand nombre de cultures pour un essai de ce genre; j'ai opéré sur 45 cultures faites dans des boîtes de 25 centimètres de diamètre; les voiles avaient 36 heures d'âge; on les a tous réunis et pressés ensemble avec une puissante presse à bras; le tourteau qu'on a obtenu pesait 475 grammes.

On l'a broyé dans des mortiers avec du sable fin de Fontainebleau et, pour compléter la dilacération des cellules, sur une plaque épaisse de verre rodé à l'aide d'une forte mollette rodée. On a alors mélangé du tripoli en quantité suffisante pour faire une pâte liante qui a été conservée dans la glace fondante pendant les préparatifs de la presse hydraulique. — La pâte a été soumise à une pression de 400 atmosphères,

chiffre limite que l'on a atteint graduellement en faisant surtout de longues pauses aux pressions faibles entre 0 et 50 atmosphères. On a recueilli ainsi environ 200 c.c. de suc cellulaire dans un récipient placé dans la glace fondante. Le liquide était trouble et renfermait surtout des globules gras dont le mycélium est bourré; chauffé à 70-80°, il se prend en masse; son odeur est agréable et rappelle celle de la levure; l'odeur caractéristique de champignon a à peu près disparu.

Pour recuillir la totalité du gaz produit et pour évaluer l'alcool avec toute la précision voulue, j'ai introduit le suc à raison de 25 c.c. dans des ballons de 1 litre à col étiré et effilé; on y avait placé au préalable $7^{gr},5$ de glucose et on les avait stérilisés à 120° de façon à réduire d'autant les causes étrangères de fermentation. Le suc mycélien étant introduit, on y a fait le vide et on les a scellés à la lampe. Ces ballons pouvaient donc contenir, sans danger de rupture, 2 grammes de CO^2, ce qui est largement suffisant comme on va le voir.

Les ballons ont été placés à la température de 30°; la fermentation s'est déclarée instantanément favorisée par le vide dans sa manifestation extérieure; mais le suc ne mousse pas; il pétille à la façon des cuves de mélasse ou de moût de grain en fermentation; dans les tubes à essai il se forme une couronne de mousse de 0,5 centimètre d'épaisseur, à la température de 35°; mais ce n'est pas non plus une mousse persistante; elle tombe par agitation, en même temps que se blanchit, par les bulles du gaz, la masse de liquide en fermentation.

A la température de 36-37°, la fermentation se ralentit brusquemment au bout de 5 heures environ; à 30° elle se poursuit pendant une dizaine d'heures; il est donc inutile de faire usage d'antiseptiques; les ferments n'ont pas encore eu le temps d'intervenir, et, effectivement, tout dégagement s'arrête quand la zymase a perdu son activité.

Il est inutile également de poursuivre plus longtemps les expériences puisque la quantité de sucre transformé ne varie plus; aussi les deux expériences que je rapporte dans le tableau IV ont été arrêtées en même temps; la 3e a été faite avec 60 c. c. de suc additionnés de 18 grammes de glucose et placé à la température de 38° après 4 heures de conservation dans la glace; l'activité de la zymase avait déjà diminué; cette expérience

ayant été faite en vase ouvert, je n'ai évalué que l'alcool.

Les gaz des ballons scellés ont été extraits par la pompe à mercure et le CO^2 mesuré sur le mercure après absorption par la potasse.

Tableau IV.

Nos d'ordre.	Volume de suc.	Alcool formé.	CO^2 dégagé.
	c. c.	mgr.	mgr.
1	25	385	372,9
2	25	352	324,8
3	60	405	»

Ces résultats montrent donc que la zymase de l'Eurotiopsis ; peut être isolée très facilement par pression du mycélium broyé mais si on remarque que 1 c. c. de suc correspond à peu près à 1 gramme de mycélium sec, on voit qu'on n'a pu obtenir de cette façon qu'une faible portion de la diastase présente, environ 1/12.

ZYMASE DES CHAMPIGNONS ET DES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

Les courbes figure 4 représentent les variations de la zymase suivant l'âge du mycélium, ou dans un même mycélium suivant la durée du séjour à l'abri de l'air.

Puisque la richesse du champignon en diastase décroît rapidement avec l'âge, il est facile de prévoir le moment où une culture traitée comme je l'ai indiqué, tableau II, fournira une courbe de la forme M ; cette courbe correspond à une culture qui est privée de zymase au moment où on la place à l'abri de l'air; elle en récupère peu à peu par régénération, si bien que les quantités de zymase observées de jour en jour augmentent peu à peu, passent par un maximum, et décroissent ensuite lentement jusqu'à 0.

Si on rappelle que tous les végétaux placés à l'abri de l'air présentent les mêmes phénomènes, cette courbe prend un grand intérêt, car elle est la reproduction graphique fidèle de la marche des fermentations qu'on a si souvent observées dans les milieux privés d'oxygène.

Rapportée à des cas isolés, cette courbe demeure énigmatique ; mais lorsqu'elle est rattachée à sa véritable cause, telle qu'on vient de la découvrir chez l'Eurotiopsis, elle se présente comme la suite d'une action diastasique qui a son origine dans la vie normale.

La solution de continuité qui semble exister entre les deux modes de vie n'est qu'apparente; chez la plupart des végétaux la zymase se détruit dès qu'elle a agi, par un processus dont le mécanisme nous échappe, mais qui se rattache probablement aux phénomènes d'oxydation. Comme dans le mycélium d'Eurotiopsis âgé, il y a dans ces végétaux une quantité plus ou moins grande de zymase susceptible de se régénérer, ou de reprendre son activité dans un milieu réducteur.

On arrive ainsi, par l'observation directe, à une conclusion que j'ai dejà formulée à diverses reprises : l'assimilation du sucre exige la présence de la zymase en vie aérobie; de ce qu'on ne peut pas la mettre en évidence, on ne peut pas conclure à son absence, la régénération à l'abri de l'air vient prouver qu'elle a existé en vie aérobie.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

A côté des conclusions particulières que j'ai exposées à leur place, à la suite des faits qui les établissent, il y a des conclusions d'une portée plus générale qui découlent de l'ensemble de cette étude.

Elle peuvent se résumer dans la proposition suivante : Les phénomènes de fermentation représentent des actes de digestion.

Chaque produit de fermentation marque une étape dans la marche du travail digestif. Si un ferment utilise comme aliment de l'amidon, par exemple, les dextrines, le maltose, le glucose, les alcools éthylique ou butylique, les acides lactique, acétique, butyrique, propionique, etc., ont la même signification physiologique ; chacun de ces corps prend naissance sous l'action d'une diastase particulière et il n'y a pas plus de raison de considérer le maltose ou le glucose comme des produits de digestion plutôt que l'alcool ou l'acide acétique.

Tous ces produits peuvent être abondants ou rares dans les liquides en fermentation ; s'il y en a qui s'accumulent, cela tient à ce que les diastases qui leur donnent naissance agissent indépendamment de la cellule vivante et ne règlent pas leur action sur ses besoins.

A mesure que l'être vivant se complique et que les cellules qui le forment se perfectionnent et se différencient, un certain

nombre de ces produits disparaissent de la circulation; ce sont les plus dégradés et en même temps les plus dangereux pour la vie de la cellule; dans les végétaux supérieurs on ne trouve plus d'alcool ni de zymase; pour mettre ces produits en évidence, il faut priver d'air, pendant un temps plus ou moins long, la plante entière ou simplement une fraction quelconque de cette plante.

Dans les conditions normales de son développement, l'alcool et l'aldéhyde sont assimilés sur le lieu même de leur formation; la localisation de la zymase et sa fixation sur les substances protoplasmiques sont en quelque sorte des mesures de garantie pour l'existence de la cellule vivante, et la précaution dans ce sens va jusqu'à la destruction de la zymase à mesure qu'elle a agi, si bien que rien ne peut faire soupçonner sa présence dans la plupart des végétaux.

On peut cependant la mettre en évidence par des artifices d'expérience dans les conditions de vie normale; j'ai montré que les cotylédons de pois en voie de germination fournissent à la plantule non seulement des dextrines et du sucre, mais encore de l'alcool en abondance[1].

Si l'on se contente d'observer dans les conditions ordinaires la marche de la nutrition chez les microbes et chez les végétaux supérieurs, on est frappé de la contradiction qui existe à ce point de vue entre ces deux séries d'êtres vivants.

Les premières notions sur l'alimentation ont été tirées de l'étude des animaux et des végétaux supérieurs; les microbes ne sont venus que beaucoup plus tard et comme ils ont tout de suite présenté des phénomènes qui ne rentraient pas dans le cadre des idées établies, on les a mis à part; les produits des fermentations qui paralysent bientôt les ferments ont été considérés comme des produits de désassimilation.

Une barrière intranchissable semblait ainsi se dresser entre les infiniment petits et le reste du monde vivant; mais en y regardant de près, on a trouvé des intermédiaires entre ces deux grandes catégories d'êtres, et les espèces comme l'Eurotiopsis gayoni ne constituent pas des exceptions; au point de vue de la nutrition hydrocarbonée, les besoins de l'Eurotiopsis sont les mêmes que ceux de l'aspergillus par exemple; la seule différence qui existe entre eux c'est que la zymase est abondante

1. Ces *Annales*, 1er Mémoire.

dans le premier et absente en apparence dans le second, tous deux se nourrissent cependant d'alcool quand on leur offre du sucre ; tout se réduit à une question de quantité de diastase, exactement comme chez le pois et l'orge, deux graines amylacées, où tout l'amidon disparaît pendant la germination sous l'action de l'amylase ; mais il est difficile de mettre cette dernière diastase en évidence chez le pois, et elle est si abondante dans l'orge que l'industrie des fermentations en tire un grand parti.

DEUXIÈME PARTIE

VIE ANAÉROBIE DE LA LEVURE

Il semble que les conclusions fournies par l'étude de la zymase de l'Eurotiopsis puissent s'appliquer aussi à la levure.

On sait en effet que la levure cultivée en surface, sur des milieux solides, ou dans un liquide en couche mince, construit surtout de la substance vivante et ne produit pas d'alcool ; elle renferme peu ou pas de zymase ; si on ménage l'accès de l'air par un moyen quelconque, le poids de cellules diminue en même temps que l'alcool augmente, la zymase devient abondante. Tous ces faits rentrent dans le cadre de ceux que nous venons d'examiner.

Mais la levure possède une propriété que l'on ne trouve ni chez les champignons ni chez les végétaux, elle se multiplie à l'abri de l'air même dans une solution de sucre dans l'eau distillée, si on la prend à état convenable. L'Eurotiopsis, je le répète, ne pousse pas à l'abri de l'air ; ses spores ne germent ni dans le liquide Raulin ni dans un milieu organique, si on les prive d'oxygène libre. C'est un végétal strictement aérobie. La levure est à la fois aérobie et anaérobie.

En vie aérobie elle consomme une quantité d'oxygène que l'on peut évaluer au double de son poids approximativement ; lorsqu'elle se multiplie dans un milieu dépourvu d'oxygène libre, elle doit emprunter cet élément au sucre.

Elle ne peut pas le demander à l'alcool qui est un aliment de la vie aérobie ; elle n'assimile pas non plus le sucre en nature, car sa composition élémentaire s'éloigne trop du sucre ; il faut donc admettre qu'elle met en œuvre un processus d'assimilation anaérobie que l'on a ignoré jusqu'ici : c'est ce que je me propose d'établir maintenant.

Le développement de la levure s'accompagne toujours de la production de glycérine, d'acide succinique et d'acide acétique; on regarde ces composés comme des produits de désassimilation. Si on néglige cette opinion pour les considérer comme des produits de digestion, l'attention doit se porter de préférence sur les acides, car la glycérine se prête aux mêmes objections que le sucre; les acides présentent cet avantage de faire partie intégrante des substances protoplasmiques; l'acide acétique en particulier y occupe une place importante; il est donc possible qu'il puisse servir d'aliment de la vie anaérobie; M. Duclaux[1] a montré que c'est un produit de désassimilation de la levure; rien de plus naturel s'il entre dans sa constitution; mais c'est une raison pour qu'il remplisse le rôle que je lui suppose; si les phénomènes de protéolyse le mettent en liberté, cela prouve qu'il existe à l'état combiné dans les albuminoïdes de la levure et en quantité assez élevée, puisque l'ammoniaque qui se forme aussi dans les mêmes conditions ne suffit pas à le saturer.

Cet acide est d'ailleurs très répandu dans les fermentations anaérobies, où il se présente comme un produit de dédoublement du sucre; et comme on doit considérer maintenant les phénomènes de fermentation comme des actes de digestion, l'acide acétique représente un processus de digestion anaérobie du sucre. Mais ce corps possède la même composition élémentaire que le sucre, et à ce titre il ne peut pas satisfaire aux conditions que l'on est en droit d'exiger d'un aliment anaérobie de la levure.

C'est le moment de faire remarquer encore que l'acide acétique ne se présente jamais seul dans les fermentations anaérobies; il est toujours accompagné d'un alcool; c'est l'alcool éthylique dans toutes les fermentations lactiques; c'est l'alcool butylique dans les fermentations butyriques. Les deux fonctions chimiques se complètent au point de vue physiologique, et comme l'alcool est plus pauvre en oxygène que la levure, l'acide acétique plus riche, l'assimilation des deux aliments en proportion convenable conduit à la moyenne voulue. Le raisonnement fournit, comme on le voit, la réponse à la question posée.

Mais il faut interroger les faits et leur demander la confirmation de ces déductions.

1. *Annales de l'Ecole normale supérieure*, t. I, 1865.

Un produit de fermentation peut être regardé comme un produit de digestion s'il est assez abondant[1], c'est-à-dire en proportion telle par rapport aux poids de matière vivante formée et *à la durée de l'expérience* qu'on ne puisse le considérer comme un produit de désassimilation. On voit de suite qu'en portant sur ce terrain le principe d'une méthode de recherche, le facteur le plus important dans une fermentation est toujours le poids du ferment et c'est ce qu'on a généralement négligé. Les produits les plus intéressants à déterminer sont ensuite les acides, du moins dans les conditions où je me place.

Ces conditions imposent en outre l'obligation de faire un choix de la levure. Les levures de brasserie et les levures de vins les mieux étudiées doivent être écartées parce qu'elles sont estimées justement en raison de la faible acidité qu'elles donnent aux milieux qu'elles font fermenter.

Je me suis adressé à une levure de distillerie de mélasse, très rustique, capable de faire fermenter des solutions riches à 30 et 40 0/0 de sucre à une température de 30 et 35° au besoin. L'utilité de ce choix est évidente; si l'acide acétique est un produit de digestion, la diastase acétique agit d'autant plus longtemps que le sucre est plus abondant. car la zymase le lui dispute énergiquement; son action sera d'autant plus rapide que la température sera plus élevée.

Comme appareil, je me suis servi du ballon figure 2; la levure peut être introduite par la tubulure latérale, de sorte que le ballon est entièrement préparé d'avance. La levure est empruntée à des cultures en surface, faites à la température de 30° dans des fioles coniques de 500 c. c. ou 1 litre de capacité. La gélose forme une couche de 2 ou 3 centimètres d'épaisseur. Pour faire une prise de semence, on met rapidement la culture en suspension dans de l'eau distillée stérile, et on répartit dans les ballons de culture des volumes égaux de la dilution contenant un poids connu de levure. On remplace l'air du ballon par de l'hydrogène, en prenant la précaution de chasser l'air aussi

1. Un produit de digestion est quelquefois en quantité très faible ou fait complètement défaut dans un liquide de fermentation : par exemple, le sucre interverti dans le cas du saccharose, l'alcool vis-à-vis des hexoses fermentescibles ; mais lorsqu'il s'agit de l'acide acétique, qui peut se présenter comme un produit d'autophagie de la levure, il est nécessaire de faire intervenir les notions de quantité et de temps, si on se propose de le rattacher à un processus de digestion.

complètement que possible. On ouvre alors sous le mercure et on recueille le gaz sous le mercure. Toutes les cultures ont été faites dans du bouillon de haricot ; j'ai employé ce milieu qui vaut d'ailleurs tous ceux qui sont en usage pour la culture de levure, parce qu'il y en a toujours dans le laboratoire ; la température que j'ai adoptée est enfin la température de 30°; les cultures qui ont fourni les semences avaient toujours 4 ou 5 jours.

Avant d'aborder le fond du problème que je me suis posé, je donnerai quelques renseignements sur les propriétés de la levure que j'ai utilisée[1].

Le tableau suivant montre quelle est sa puissance de multiplication à l'abri de l'air.

TABLEAU V.

Nos d'ordre.	Volume du bouillon.	Concentration en sucre.	Poids de la semence.	Poids de la culture.	Durée de l'expérience.
—	—	—	—	—	—
	c. c.	0/0	mgr.	mgr.	jours.
1	210	40 (saccharose).	37	364,8	7
2	id.	id.	id.	265,5	11
3	id.	id.	id.	253	15
4	—	—	id.	270,6	24
5	—	—	80	514	4
6	—	—	id.	482,1	8
7	—	—	id.	410,7	11
8	1.010	30	54	1.459,9	8
9	id.	id.	0,001	705,5	8
10	530	2 (glucose).	44,8	777,2	45 h.
11	id.	id.	id.	797,8	51 h.

Le poids de la levure formé à l'abri de l'air est relativement élevé ; tout son oxygène a été emprunté aux aliments qu'on lui a offerts; le poids maximum est atteint rapidement en moins de 48 heures dans un volume de 200 c. c. de bouillon, en 48 heures à peu près dans un volume de 500 c. c.

A partir de ce moment, la levure s'autophagie et son poids diminue rapidement.

Le poids de levure formé ne dépend pas de la richesse du milieu en sucre; il est à peu près aussi élevé, eu égard au volume du milieu, dans un bouillon à 2 0/0 que dans un bouillon à 30 ou 40 0/0.

La multiplication de la levure est limitée en l'absence d'oxygène ; cette conclusion découle des résultats fournis par les cultures 8 et 9. Ces deux cultures ont reçu le même volume de

1. Ces propriétés sont communes à toutes les levures ; je ne les donne pas comme des résultats nouveaux bien entendu.

liquide ; elles ont reçu la même semence et ont été faites simultanément; si le poids varie du simple au double, c'est parce qu'un globule de levure qui se multiplie à l'abri de l'air ne peut pas se reproduire indéfiniment ; dans la culture 9, la quantité d'aliments disponibles n'est pas utilisée parce que la puissance de prolifération des quelques globules ensemencés n'est pas assez grande; dans la culture 8, où le poids de semence est suffisant, le milieu a été épuisé si on prend comme terme de comparaison les résultats fournis par les autres cultures. Cette expérience conduit à la même conclusion que celle de Denys Cochin[1] dont elle n'est qu'une variante simplifiée.

La puissance de prolifération de la levure est à peu près la même au contact de l'air, c'est-à-dire dans un liquide qui fermente en vase ouvert, ou à l'abri de l'oxygène, à condition que le volume du bouillon ne soit pas exagéré par rapport au poids de la semence.

Cette conclusion découle des résultats du tableau VI obtenus avec des cultures de 200 c. c., réalisés dans des ballons de 250 c. c., les uns ouverts, les autres privés d'air par le procédé ordinaire.

Tableau VI.

Nos d'ordre.	Alcool 0/0.	Acidité totale en $C^2H^4O^2$.	Poids de la semence.	Poids de la culture.
—	—	—	—	—
	volume	mgr.	mgr.	mgr.
		Vie anaérobie.		
1	9,57	219,2	10	264,2
2	8,66	206,6	2,5	245,8
3	7,57	178,9	traces	311,6
4	8,66	186,4	id.	312,1
		Vie aérobie.		
1	9,85	219,2	10	364
2	9,42	204,1	2,5	343,9
3	9	201,6	traces	354,3
4	9,28	209,1	id.	384,2

Les résultats, comme on le voit, sont en faveur des cultures aérobies ; mais la différence n'est pas grande.

On peut se demander maintenant quelle est l'influence de l'oxygène sur la composition élémentaire de la levure ; les éléments de comparaison sont réunis dans le tableau VIII. Les cultures qui ont fourni la levure soumise à l'analyse ont été

1. *Annales de Phys. et Chimie*, 1880.

faites les unes dans du bouillon de haricots neutre à 10 0/0 de saccharose, les autres dans un milieu minéral à 20 0/0 de saccharose préparé avec des cendres de levures, neutralisé avec de l'acide acétique et additionné de 2 0/00 d'acétate d'ammoniaque ; elles ont été réalisées à l'abri de l'oxygène.

Le tableau VII fournit tous les renseignements relatifs à ces cultures au moment où elles ont été arrêtées.

TABLEAU VII.

Nature des milieux.	Durée des cultures.	Poids de levure recueillie.	Acidité totale $C^2H^4O^2$.	Alcool en v.
		mgr.	mgr.	0 0
Bouillon de haricots..	3 jours.	448,2	163,2	5,25
	12 jours.	338	176	5,3
Milieu minéral.......	3 jours.	196,5	191,2	4
	12 jours.	243,7	270,7	9,3

Le poids de semence fourni était de 88^{mgr}, 2.

Voici maintenant les chiffres qui expriment la composition élémentaire de la levure recueillie dans ces 4 cultures sont les suivants :

TABLEAU VIII.

	Semence culture de 4 jours, en surface.	Composition de la levure après 3 jours de culture anaérobie.		Composition de la levure après 12 jours de culture anaérobie.	
		Milieu organique.	Milieu minéral.	Milieu organique.	Milieu minéral.
C........	51,54	51,45	48,02	47,62	48,67
H........	7,82	7,37	7,69	8,06	8,26
Az.......	5,13	5,27	5,4	4,45	4,15
O+S....	35,91	35,91	38,89	39,87	38,92

Dans ces chiffres, on n'a pas tenu compte des variations des cendres; la composition de la semence donne par comparaison la constitution élémentaire de la levure aérobie avec celle de la levure anaérobie ; on voit qu'elle ne varie pas beaucoup d'un mode de vie à l'autre: l'influence de l'autophagie qui se traduit dans la culture de 12 jours s'exerce dans le même sens dans les deux milieux.

RECHERCHE DE L'ALIMENTATION DE LA LEVURE EN VIE ANAÉROBIE

Des renseignements qui précèdent, il résulte que la levure conserve la même composition élémentaire, soit qu'elle emprunte en grande partie son oxygène à l'air, soit qu'elle le prenne exclu-

sivement aux aliments qu'on lui offre. Il est évident que dans un milieu organique, les matières azotées complexes favorisent la prolifération anaérobie de la levure; mais il n'en est pas moins vrai qu'elle peut s'en passer; elle se multiplie activement dans un milieu minéral qui ne renferme comme aliments carbonés que l'acide acétique et le sucre; tableaux III et IV; cette sélection très avancée des aliments restreint beaucoup les conditions du problème que l'on s'est posé, et c'est à dessein que j'ai choisi l'acide acétique pour neutraliser le milieu minéral et pour convoyer l'aliment azoté. C'est en effet l'acide acétique qui semble destiné à jouer le rôle d'aliment anaérobie de la levure.

L'acidité augmente avec la concentration en sucre.

Les chiffres consignés dans le tableau IX le démontrent :

TABLEAU IX.

Nos d'ordre.	Concentration en saccharose.	Acidité totale par litre de culture en $C^2H^4O^2$.
—	—	—
	0/0	mgr.
1	10	1.065
2	20	1.530
3	30	2.265
4	40	1.934

Ces cultures, effectuées à l'abri de l'air, ont reçu une trace de semence.

Les variations d'acidité sont dues surtout aux variations de l'acide acétique. Cette proposition résulte des chiffres fournis par des cultures effectuées sur 210 c. c. de bouillon et ensemencées avec 58^{mgr},9 de levure. Ces chiffres sont réunis dans le tableau suivant :

TABLEAU X.

Nos d'ordre.	Concentration saccharose.	Acidité totale dans la culture $C^2H^4O^2$.	Acidité volatile dans la culture $C^2H^4O^2$.	Alcool 0/0.	Poids de la levure.
—	—	—	—	—	—
	0/0	mgr.	mgr.	vol.	mgr.
1	5	547	214	3	395,2
2	10	722	366	5,56	425,8
3	20	1.145	751	11	418,5
4	40	1.268	945	10,25	366,3

Les variations de l'acide acétique avec la concentration en sucre dénotent autre chose qu'un phénomène de désassimilation; on ne peut interpréter ce résultat qu'en admettant un dédoublement immédiat de sucre en acide acétique par l'intermédiaire

d'une diastase; on s'explique que l'acide acétique augmente avec la richesse du milieu en sucre, parce que dans un bouillon de faible concentration la zymase détruit rapidement tout le sucre. Dans la culture n° 4, où la levure est déjà gênée, il y a cependant plus d'acide acétique que dans les autres parce qu'il y a un très grand excès de sucre.

La réaction du milieu exerce une influence très grande sur la production d'acide acétique. Les milieux alcalins l'exaltent; les milieux acides l'atténuent, du moins dans les limites où je me suis placé. L'acidité a été obtenue par l'addition d'acide tartrique; l'alcalinité par l'addition de carbonate de sodium. L'introduction de ces composés dans les milieux de culture doit se faire avec quelques précautions. Les milieux sont stérilisés pendant qu'ils sont neutres; les solutions d'acide ou de carbonate de sodium, exactement titrées, sont stérilisées à part; au moment de l'ensemencement on les introduit dans les milieux de culture, et on substitue le plus vite possible l'hydrogène à l'air, dans les récipients, afin de soustraire les milieux à l'action de l'oxygène qui brunit rapidement le milieu alcalin, même à froid.

Le tableau XI donne le résumé des résultats obtenus avec des milieux additionnés de doses variables d'acide tartrique ou de carbonate de sodium. Le volume de bouillon employé était de 230 c. c. à la concentration de 40 0/0 de saccharose. Les cultures ont duré 26 jours à 30°; le poids de la semence était de 50mgr.

TABLEAU XI.

Nos d'ordre.	Réaction des milieux.	Acidité finale en $C^4H^6O^6$ ou $C^2H^4O^2$.	Acidité formée en acide acétique.
—	—	— 0/00	— 0/00
1	Neutre.	2,120 $C^2H^4O^2$	2,120
2	Acide, 1 0/0, $C^4H^6O^6$	11,38 $C^4H^6O^6$	1,104
3	id. 1,5 0/0, id.	15,727 id.	0,581
4	id. 2 0/0, id.	20,000 id.	0,000
5	Alcaline, 2 0/00, NaOH	0,582 $C^2H^4O^2$	3,582
6	id. 5 0/00, id.	0,000 id.	7,500

On voit donc que si l'on veut faire produire à la levure des doses élevées d'acide, il faut la cultiver au milieu alcalin; la levure que j'ai employée se comporte ainsi comme les ferments producteurs d'acide. Quand on veut faire produire beaucoup d'acide à des microbes, il faut additionner les milieux de carbonate de calcium; j'ai employé du carbonate de sodium parce qu'il a l'avan-

tage de ne pas troubler les milieux et de permettre ainsi d'évaluer le poids des levures sans l'emploi d'aucun artifice.

Les conditions favorables à la production de doses élevées d'acide acétique étant déterminées, il ne reste plus qu'à multiplier les preuves et à établir définitivement que ce corps doit être considéré comme un produit de dédoublement du sucre par la levure à l'abri de l'air.

J'ai donc réalisé trois séries de cultures dans 220 c. c. de bouillon à 40 0/0 de saccharose et à la température de 30°. Voici les résultats que j'ai obtenus :

TABLEAU XII.

Nos d'ordre.	Durée de l'expérience.	NaOH dans les cultures.	Poids de la semence.	Acides formés en $C^2H^4O^2$.	Acide acétique.	Alcool 0/0.	Poids de la levure.
	jours.	mgr.	mgr.	mgr.	mgr.	en vol.	mgr.
				1re *série*.			
1	8	500	80,9	872,4	682	9,17	412,8
2	11	id.	id.	814,2	636	9,5	410,9
				2e *série* [1].			
3	7	1.000	28	892,6	875,8	6,956	249
4	20	id.	28	1.067,7	875,8	11	197
				3e *série*.			
5	6	id.	61	911,7	653,4	5,43	302
6	8	id.	id.	1.075	706,8	6,92	252,5
7	18	id.	id.	1.154,1	790,5	11,25	230,7
8	20	id.	30,5	915,2	721	9,16	215,4

On voit que les quantités d'acide acétique formé sont quelquefois trois fois plus élevées que les poids de levure trouvés à la fin de l'expérience, le poids de la semence compris.

Mais il faut ajouter tout de suite que les poids de levure ainsi évalués ne sont pas ceux qui ont réellement agi ; j'ai déjà dit que la levure atteint son développement maximum en moins de 48 heures ; à partir de ce moment elle s'autophagie et perd du poids ; mais il est facile d'évaluer par approximation ce poids maximum ; et pour plus de sécurité je l'évaluerai par excès ; dans les cultures en milieu alcalin, le développement est plus lent, en le considérant aussi rapide que dans les milieux neutres j'exa-

1. Lorsqu'on alcalinise à 5 0/00 environ de NaOH, à l'état de $CO^3 Na^2$, les débuts de la culture sont pénibles, surtout lorsque la quantité de semence employée est faible; cette dose est d'ailleurs une dose limite; la série 2 comprenait 4 cultures faites dans les mêmes conditions, avec cette différence que 2 avaient une atmosphère d'hydrogène et 2 une atmosphère de CO^2; ces deux dernières seules se sont développées parce que l'acide carbonique a atténué l'action nocive de l'alcalinité.

gérai encore le chiffre maximum. Pour le déterminer, il suffit de porter sur la ligne des abscisses les durées des cultures, et les poids de levure sur la ligne des ordonnées; on obtient une courbe qui, prolongée jusqu'à l'ordonnée correspondant à la durée de 48 heures, donne le poids maximum de la levure par excès (fig. 5).

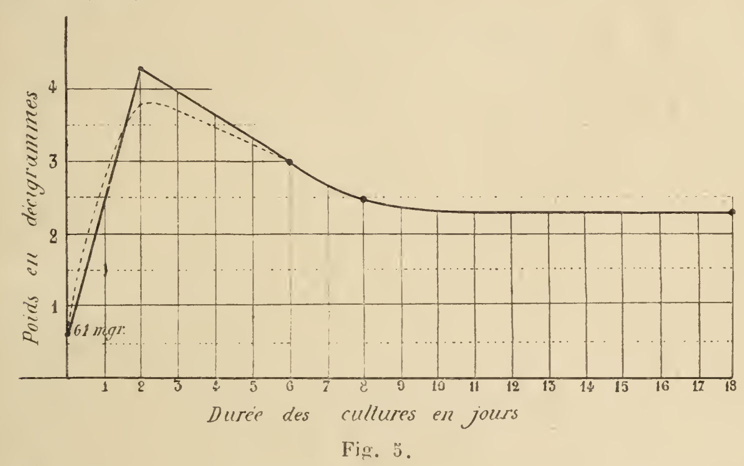


Fig. 5.

Cette courbe correspond aux cultures 5, 6 et 7; elle montre qu'au 6e jour le poids de la levure a déjà diminué du quart, de sorte qu'en exagérant de la sorte, l'acide acétique est encore le double du poids de la levure qui l'a produit.

Il faut remarquer, en outre, que ce corps se forme surtout au début de la culture ; tous les faits s'accordent donc à assigner à l'acide acétique une origine diastasique et l'on doit admettre que la levure, en se développant à l'abri de l'air, dédouble le sucre en trois molécules d'acide acétique, suivant l'équation :

$$C^6H^{12}O^6 = 3\ C^2H^4O^2$$ [1].

L'acide acétique qui accompagne partout le développement de la levure provient donc de deux sources différentes ; une

1. MM. E. Buchner et J. Meisenheimer (*Berichte d.d. Chem. Gesell.*, t. XXXII, n° 2, p. 417) ont montré que le suc de levure produit de l'acide lactique et de l'acide acétique surtout en présence de sucre 10 0/0; ils admettent que l'acide lactique est un produit intérimaire du dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique. J'ai déjà émis cette opinion dans ces *Annales*, t. XVI (3e mémoire), à la suite de mes recherches sur l'assimilation de l'acide lactique par l'Eurotiopsis. M. Buchner et son collaborateur ne donnent aucune interprétation de l'origine de l'acide acétique ; sa formation est cependant plus régulière que celle de l'acide lactique et confirme les résultats que j'ai obtenus ici par une autre méthode.

partie est due à la digestion du sucre, et une autre qui est beaucoup plus faible doit être rattachée aux phénomènes d'autophagie.

Si la levure se rapproche des ferments anaérobies véritables par la faculté qu'elle possède de se multiplier à l'abri de l'air et par les procédés de digestion du sucre qu'elle met en œuvre, elle s'en éloigne néanmoins par l'impossibilité où elle se trouve de se passer indéfiniment d'oxygène libre. Sa puissance de prolifération est limitée; une cellule peut fournir un certain nombre de générations de globules à l'abri de l'air; mais au bout d'un certain temps ces globules sont incapables de se reproduire, de sorte que si les passages se font d'un milieu dans un autre, sans prendre contact avec l'air, il arrive un moment où un milieu neuf ensemencé avec quelques cellules reste inaltéré. C'est l'expérience bien connue de Denys Cochin (*loc. cit.*), il suffit alors de laisser entrer l'air dans l'appareil pour que la levure se multiplie de nouveau et produise de la zymase. Une très petite bulle d'air suffit à ranimer l'activité éteinte de la levure (expérience de Pasteur [1]); la zymase se présente donc, dans ces conditions aussi, comme une diastase aérobie.

Puisqu'une trace d'oxygène libre fournie à une culture inerte dans un milieu neuf et tout à fait favorable au développement de la levure suffit pour la ranimer, cela prouve qu'elle ne pouvait pas, par ses propres ressources, tirer cet oxygène de ses aliments ou de l'eau.

Les véritables ferments anaérobies possèdent ce pouvoir; ils décomposent l'eau et se servent de son oxygène pour faire des combustions, et comme cette source est illimitée, ils peuvent vivre indéfiniment à l'abri de l'air.

La levure se distingue donc des ferments anaérobies en ce qu'elle se montre incapable d'emprunter son oxygène à l'eau.

Cette conclusion, qui est très simple en elle-même, ne sert pourtant qu'à couvrir la difficulté. L'oxygène combiné emprunté aux aliments suffit pendant quelque temps à assurer la prolifération de la levure ainsi que toutes les fonctions de la vie cellulaire la plus active. On ne comprend pas, dans ces conditions, pourquoi ces phénomènes s'arrêtent à un moment donné.

On peut supposer que la constitution de la levure tend vers

1. Pasteur, *Etude sur la bière*, 1876, Paris.

un état d'équilibre qu'elle est incapable de rompre sans l'intervention d'oxygène libre. Lorsqu'il est atteint, tout travail d'assimilation s'arrête; voilà ce que l'on observe. Mais le mécanisme intime du phénomène semble difficile à saisir.

CONCLUSIONS.

L'acide acétique doit être considéré comme l'aliment ternaire anaérobie de la levure; il dérive directement du sucre par voie de dédoublement suivant l'équation :

$$C^6H^{12}O^6 = 3C^24^40^2.$$

Il remplit donc vis-à-vis de la levure le rôle qui lui est dévolu dans toutes les fermentations anaérobies.

Grâce à ce processus de dédoublement du sucre, la levure se multiplie à l'abri de l'air; elle peut, dans ces conditions, produire et accumuler de la zymase en grande quantité et acquérir toute sa valeur industrielle.

Comme la zymase semblait se former seulement à l'abri de l'air, on avait basé sur cette particularité une théorie de la fermentation alcoolique : c'étaient les combustions produites par l'oxygène libre qui fournissaient l'énergie nécessaire à la multiplication de la levure en vie aérobie; c'était le dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique qui lui procurait cette énergie quand on la privait d'oxygène; de là l'inutilité de la zymase en vie aérobie et sa nécessité dans la vie anaérobie.

Cette conception doit être modifiée. La zymase existe toujours dans la vie aérobie; mais elle ne se conserve pas, elle disparaît sous l'influence des phénomènes d'oxydation par un mécanisme difficile à déterminer expérimentalement; elle ne préside pas moins à l'assimilation du sucre en présence de l'air. Ce qui semble caractériser la vie anaérobie, c'est que la diastase en question s'accumule dans la cellule; mais l'alcool qu'elle produit ne pourrait être assimilé si la levure ne mettait en œuvre un autre mode de digestion du sucre que je viens d'étudier : la production d'acide acétique qui est la vraie caractéristique de la vie anaérobie.

Le dédoublement du sucre en alcool et acide carbonique dans la proportion où la levure l'accomplit ne correspond pas à un besoin d'énergie. Ce travail se produit indépendamment d'elle et la

chaleur qu'il dégage se traduit par une élévation rapide de la température des cuves en fermentation.

Il faut remarquer d'ailleurs que presque tout l'alcool produit par la levure se forme précisément après la période de multiplication, c'est-à-dire à un moment où la levure non seulement n'absorbe pas d'énergie, mais en dégage au contraire en raison des phénomènes de désassimilation dont elle devient le siège.

Je ne veux pas dire par là que l'énergie produite par la fermentation alcoolique du sucre ne soit utilisée à aucun moment; le contraire est évident; cette réaction diastasique contribue pour sa part à la multiplication de la levure, au même titre que toutes celles que la cellule est capable d'accomplir.

Il est même probable que l'alcool est assimilé à la faveur de l'acide acétique. Il serait possible d'établir expérimentalement ce fait s'il n'y avait pas d'autre source de CO^2 que la fermentation alcoolique.

Si une partie de l'alcool est assimilée, le CO^2 correspondant vient en excédent sur la quantité qui se rapporte à l'alcool resté libre.

Il suffit donc de doser l'acide carbonique et l'alcool dans une fermentation faite complètement à l'abri de l'air, pour résoudre la question.

Mais il faut prendre la précaution de réduire autant que possible la teneur du milieu en sucre; on conçoit, en effet, que dans ces conditions la proportion d'alcool utilisé par rapport à celui qui reste libre peut devenir assez grande pour que les chiffres fournis par l'expérience aient une signification nette.

Mais on n'a pas le droit d'admettre que la fermentation alcoolique soit l'unique source de CO^2 dans une culture de levure faite à l'abri de l'air. Malgré l'absence d'oxygène libre, la cellule réalise des combustions qui se traduisent certainement par la production d'acide carbonique et d'eau. Il n'est donc pas possible d'aboutir à une conclusion précise.

J'ai fait néanmoins ces déterminations sur deux expériences réalisées avec 500 c. c. de bouillon de haricot, additionnés de 10 gr. de glucose pur. Les cultures ont été faites dans des ballons de 3 litres dans le vide obtenu par la pompe à mercure. La pression finale du CO^2 à l'intérieur des ballons était donc inférieure à la pression atmosphérique. Pour éviter toute rentrée d'air,

tous les joints des appareils étaient noyés sous le mercure. A la fin de l'expérience, on a pris toutes les précautions pour empêcher toute perte d'alcool pendant l'extraction du gaz, faite encore à l'aide de la pompe à mercure.

Voici les résultats que les deux cultures ont fournis dans ces conditions, à la température de 30°:

TABLEAU XIII.

	I	II
Durée de l'expérience en heures	45	51
CO^2 dégagé en volume à 760 et à 0°, en c. c.	2319,4	2441,2
— , poids, en mgr	4568,4	4808,7
Alcool restant, en mgr	4428,4	4469,3
CO^2 correspondant à l'alcool, en mgr	4235,8	4274,9
Différence avec CO^2, total, en mgr	332,6	533,8
Poids de levure recueillie, en mgr	777,2	797,8
— — introduite, —	44,8	44,8
— de la levure formée, —	732,4	753

On voit donc que le CO^2 produit est très nettement supérieur à la quantité qui correspond à l'alcool libre; cela prouve qu'il y a de l'alcool assimilé probablement, en même temps que du CO^2 produit par les combustions qui accompagnent le développement de la levure.

— En résumé, la levure possède une vie anaérobie[1] très limitée; la production d'acide acétique aux dépens du sucre caractérise ce mode de vie; mais la levure assimile en même temps de l'alcool. Ainsi, les fermentations qui accompagnent le développement de la levure à l'abri de l'air rappellent celles que produisent les ferments anaérobies stricts; mais la levure se distingue de ces derniers en ce qu'elle ne peut pas emprunter d'oxygène à l'eau; c'est pour cela que sa prolifération est limitée en l'absence d'oxygène libre.

La zymase s'accumule dans les cellules à l'abri de l'air, et comme elle peut se conserver longtemps dans ces conditions, son action se poursuit pendant des semaines et des mois, indépendamment des besoins de la levure.

1. L'expression *vie anaérobie* n'a pas ici une signification rigoureuse ; il reste forcément des traces d'oxygène dans le milieu, mais il n'en est pas moins certain que les conditions de vie imposées à la levure par le dispositif employé permettent de mettre en lumière un processus de dislocation du sucre dont le rôle devient très important à l'abri de l'oxygène libre.

Contribution à l'étude de la pathogénie de la crise

DANS LA PNEUMONIE FIBRINEUSE

PAR LE PROFESSEUR N. TCHISTOVITCH

La pneumonie fibrineuse est une maladie de choix pour l'étude des phénomènes de la crise. Dans la pneumonie typique, la crise est en effet très caractéristique : l'agent pathogène de cette maladie, le pneumocoque de Fraenkel, est bien étudié et, chez certains animaux, on peut reproduire une maladie présentant de grandes analogies avec la pneumonie chez l'homme.

Chez les animaux, le pneumocoque détermine des effets pathologiques variables suivant l'espèce inoculée, la résistance plus ou moins grande à l'infection, et la virulence du microbe infectant. Chez la souris et chez le lapin, l'infection prend ordinairement le caractère d'une septicémie; par contre, chez le chien et le mouton, lorsqu'on leur introduit, par la trachée, des cultures, directement, dans le poumon, on peut reproduire une pneumonie, frappant des lobes entiers du poumon, comme dans la pneumonie fibrineuse chez l'homme (Gamaléia (1), Tchistovitch N. (2). Mais aussi, chez ces animaux, il peut se produire une septicémie, si le pneumocoque est très virulent.

Le même phénomène s'observe chez l'homme : à côté de pneumonies typiques, on observe parfois des cas graves d'infection pneumococcique, présentant, à côté d'une réaction locale peu intense, des symptômes graves d'infection généralisée.

On peut, de cette manière, reproduire chez des animaux les différents types de l'infection pneumococcique, et étudier un grand nombre de phases de ce processus intéressant.

Nous nous proposons d'examiner dans ce travail les données expérimentales, permettant de se rendre compte, dans une certaine mesure, de la pathogénie de la crise dans la pneumonie.

1. Communication faite à la séance des sections réunies de bactériologie et des maladies internes, au 9e Congrès de Pirogoff, à Saint-Pétersbourg, le 10 janvier 1904.

La crise chez le pneumonique s'annonce par une défervescence brusque : la température, très élevée pendant la fièvre, tombe à la normale, et même au-dessous de la normale. Cette défervescence s'accompagne de la diminution de la fréquence du pouls, et de l'amendement de tous les symptômes généraux : la toux et la dyspnée qui tourmentaient le malade diminuent ordinairement d'une façon considérable, la peau se couvre de sueurs, la quantité d'urine augmente.

Le changement critique survenu dans l'état du malade ne trouve pas son explication dans les signes fournis par l'examen objectif : la percussion et l'auscultation montrent ordinairement que les signes de l'hépatisation du lobe malade n'ont pas disparu; il existe toujours de la matité, de la bronchophonie, et, très souvent, du souffle tubaire, auquel se mêlent, par-ci, par-là, des râles crépitants abondants. Ce n'est que les jours suivants que tous ces phénomènes disparaissent graduellement.

Parmi les phénomènes de la crise, les modifications qui surviennent dans l'urine et dans le sang présentent un grand intérêt.

En même temps que l'urine devient plus abondante et plus riche en urée et autres composés d'azote (Scheube (3), N. Tchistovitch (4), Abramovitch (5), on y constate aussi une augmentation considérable de chlorure, dont la quantité, au plus fort de la maladie, était très petite. La toxicité de l'urine subit, de même, une modification brusque.

D'après les recherches de MM. Royer et Gaume (6), la toxicité de l'urine, pendant l'évolution de la pneumonie, est au-dessous de la normale, mais, au moment de la crise, elle augmente d'une façon notable.

La décharge urotoxique, la plus forte et la plus fréquente, commence la veille de la crise et se continue pendant 1-2 jours après la crise.

Dans le sang, on observe aussi des phénomènes très intéressants. Pendant la période fébrile, le nombre des leucocytes augmente d'une façon notable et atteint un chiffre 2-3 fois plus grand qu'à l'état normal. Simultanément, avec la crise de défervescence, ou avant cette crise, il se produit une crise sanguine, se manifestant par la diminution du nombre de leucocytes jusqu'au chiffre normal (Hayem (7), Kikodse (8), etc.)

Voyons maintenant jusqu'à quel point les recherches expérimentales permettent d'expliquer le rôle et l'enchaînement de tous ces phénomènes.

On peut considérer aujourd'hui comme établi que la pneumonie fibrineuse typique est déterminée par la pénétration des diplocoques de Fraenkel dans les voies respiratoires. Par contre, il est loin d'être élucidé pourquoi cette maladie prend une évolution régulière et cyclique, se terminant par une crise, au bout de 5 à 10 jours.

On s'est demandé, avant tout, ce que devenaient les diplocoques dans les poumons, au moment où survenait la crise.

On a essayé de résoudre cette question par deux voies différentes : par l'examen de l'exsudat, puisé dans le poumon malade au moyen d'une seringue de Pravaz, avant et après la crise; et par l'examen microscopique des coupes, provenant également du poumon, frappé par la maladie.

En 1888, V. Pattela pratiqua une série de ponctions, avant et après la crise. Dans tous les cas où les ponctions avaient été faites avant la crise, l'exsudat contenait un grand nombre de pneumocoques. Les ponctions faites après la crise ont donné des résultats inconstants; mais dans l'exsudat provenant des ponctions, pratiquées aux heures qui suivaient immédiatement la défervescence, l'auteur a réussi à découvrir des diplocoques viables.

En pratiquant des ponctions dans les mêmes conditions, et en inoculant aux lapins et aux souris l'exsudat retiré du poumon malade, nous avons pu nous convaincre plus d'une fois *que, même après la crise, on pouvait retirer des poumons, par ponction, un exsudat contenant non seulement des diplocoques viables, mais aussi des diplocoques virulents*, tuant très rapidement les animaux, avec des phénomènes de septicémie.

Il en résulte que la crise ne peut pas dépendre de la destruction de tous les diplocoques dans les poumons : ceux-ci s'y trouvent encore, en ce moment, en quantité considérable. On peut les trouver aussi en abondance dans les crachats des malades; l'organisme est devenu cependant immunisé, il a acquis certains moyens de défense.

En 1889-1890, au laboratoire du professeur Metchnikoff, j'ai essayé de suivre le sort des diplocoques dans le poumon malade

par une autre voie, notamment par l'examen microscopique (10).

Après avoir déterminé la pneumonie chez des chiens, en introduisant dans leur trachée des cultures de diplocoques, je les sacrifiais aux différentes périodes de la maladie, et j'examinais au microscope les coupes, provenant des poumons malades.

J'ai pu alors constater que, chez les chiens en voie de guérison, il se produit un englobement très manifeste des diplocoques par les phagocytes pulmonaires (par les leucocytes pénétrant dans les cavités alvéolaires), tandis que, chez les animaux qui succombaient à la maladie, la phagocytose manquait presque entièrement.

J'ai pu aussi constater le même phénomène par une autre voie.

J'introduisais sous la peau des animaux les petits dispositifs en verre de Ziegler, se composant de 2 petites lamelles en verre, posées l'une au-dessus de l'autre, et collées de façon à laisser entre elles un espace capillaire, dans lequel je faisais pénétrer la culture de diplocoques. En retirant ces lamelles, à des périodes différentes, et en examinant leur contenu, j'ai trouvé que les diplocoques, lorsqu'il s'agit de chiens, sont très rapidement englobés par les leucocytes qui y pénètrent, tandis que chez les lapins et les souris, animaux résistant très faiblement à l'infection diplococcique, les diplocoques se développent librement et la phagocytose fait défaut.

Ayant constaté une telle différence dans la manière de se comporter des leucocytes par rapport aux diplocoques, chez les animaux résistant et succombant à l'infection diplococcique, je suis allé plus loin, et j'ai voulu me rendre compte des modifications se produisant dans le sang des animaux lorsque ceux-ci luttent avec succès contre les diplocoques ou qu'ils y succombent. J'ai pu alors constater que la réaction sanguine est un indicateur très sensible du degré de virulence du microbe, ayant servi à l'inoculation de l'animal. En inoculant aux lapins des cultures de diplocoques de virulence différente, j'ai pu déterminer, dans le cas où la culture était virulente, une septicémie diplococcique, tuant rapidement l'animal, avec une décroissance progressive du nombre de leucocytes dans le sang.

Par contre, en employant des cultures atténués, je constatais une hyperleucocytose, et l'animal guérissait (11).

Le fait qu'il existe des rapports étroits entre la réaction sanguine et la virulence a été confirmé par d'autres auteurs, et il a été observé dans d'autres infections que celles provoquées par le pneumocoque.

Ainsi M. Besredka (12) a décrit une réaction sanguine tout à fait analogue lorsqu'on injecte aux animaux des combinaisons arsénicales.

En me basant sur les données que j'ai obtenues à cette époque, la défense de l'organisme contre l'infection diplococcique pouvait être esquissée de la façon suivante : (13), (14).

Après leur pénétration dans l'organisme, les diplocoques déterminent une réaction inflammatoire accompagnée d'un afflux énorme de leucocytes. Cet afflux des leucocytes se manifeste par l'hyperleucocytose dans le sang.

Le poumon malade est le siège d'une phagocytose énergique. La crise, ou en général l'amélioration de la maladie, se produit lorsque la plus grande partie des microbes a été englobée par les leucocytes.

L'explication que je donne et les recherches sur lesquelles elle est basée, ont passé inaperçues parmi les nombreux travaux parus à cette époque, et consacrés, tous, à l'étude des modifications humorales, observées dans le processus de la guérison et dans l'immunité acquise. Ces travaux avaient pour but d'élucider la question des modifications subies par les humeurs et, en particulier, par le sérum sanguin, chez les animaux immunisés contre le pneumocoque.

Déjà, dès le commencement, il a été constaté un fait très intéressant : le sérum sanguin des animaux immunisés contre le pneumocoque acquiert la propriété de prévenir la maladie, si l'on en injecte à un animal avant l'infection, et de guérir l'animal ou d'atténuer la maladie si l'on injecte le sérum pendant l'évolution de l'infection.

MM. Foa et Corbone (15), Emmerich et Favitzky (16), Foa et Peo (17), et d'autres, ont établi que le sérum des lapins immunisés contre le pneumocoque acquiert la propriété de guérir des lapins et des souris infectés par une culture de pneumocoques, et ils ont expliqué la guérison ainsi obtenue par les propriétés bactéricides de ce sérum.

Les conclusions des auteurs cités ont été confirmés, paraît-il,

par les expériences de MM. Kruse et Pansini (18). Ces auteurs ont constaté une diminution du nombre de diplocoques dans le sérum des animaux immunisés, fait consigné aussi dans un travail récent de M. Wassermann (19).

Dans un travail d'Emmerich (20), paru plus récemment, cet auteur soutient de nouveau que le sérum des animaux immunisés confère l'immunité grâce à ses propriétés bactéricides.

- Par contre, MM. Behring et Nissen (21), G. et F. Klemperer (22), Isaeff et d'autres, ont trouvé que les pneumocoques, loin de périr, se multiplient encore dans le sérum des animaux immunisés. La diminution apparente du nombre de diplocoques dans le sérum des animaux immunisés est due à l'*agglutination* des diplocoques (Isaeff). Non seulement les diplocoques ne périssent pas, d'après cet auteur, mais ils conservent même leur virulence.

Le pouvoir agglutinatif du sérum des pneumoniques sur les diplocoques a été constaté plus tard par Pane (24), Bezançon et Griffon (25), Neufeld (26), Meunes (27) et d'autres. Mais ce pouvoir agglutinatif ne pouvait pas non plus expliquer l'imunité conférée aux animaux, vu que, comme nous l'avons déjà dit, les diplocoques agglutinés ne perdent ni leur viabilité, ni leur virulence.

MM. G. et F. Klemperer, ayant obtenu des résultats satisfaisants par la sérothérapie de la pneumonie, ont attribué les propriétés curatives du sérum des animaux immunisés à son pouvoir *antitoxique*. M. Mosny (28) pensait de même que le sérum des animaux immunisés contre le pneumocoque détruisait les toxines des pneumocoques. Or, si la possibilité d'obtenir un sérum antitoxique ne saurait être niée, on ne peut cependant pas expliquer la guérison d'un animal, ayant subi l'infection pneumococcique, par l'apparition des antitoxines dans son sang. Les recherches minutieuses d'Isaeff sont sous ce rapport très concluantes.

L'étude des propriétés du sérum sanguin des animaux ayant résisté à l'infection pneumococcique, a bien montré le pouvoir préventif et curatif de ce sérum, mais la façon dont ce dernier agit n'a pas été élucidée. Quelques auteurs sont revenus, par voie d'exclusion, à la conclusion que j'ai formulée plus haut, à savoir que la phagocytose constitue le principal moyen de défense de l'organisme contre l'infection pneumococcique : à cette conclusion est arrivé M. Isaeff et, plus tard, Mennes. Ce dernier admet

que le sérum antipneumococcique curatif possède des propriétés antitoxiques, ainsi que la faculté de stimuler les phagocytes. Toutes les recherches expérimentales exposées plus haut avaient été faites sur des animaux immunisés contre le pneumocoque.

Le mécanisme de la défense de l'organisme contre l'infection pneumococcique, pouvant différer d'une espèce animale à l'autre, il était nécessaire, pour élucider le processus de la guérison chez l'homme, d'entreprendre chez lui l'étude de la pneumonie.

Comme nous l'avons déjà vu, le tableau anatomo-clinique de la pneumonie fibrineuse chez l'homme diffère de l'infection pneumococcique chez les lapins, qui avaient servi, le plus fréquemment, comme sujet pour les recherches expérimentales. En outre, les expériences se faisaient avec du sérum sanguin, c'est-à-dire avec un produit ayant déjà subi des modifications, pour ainsi dire mort. Il était nécessaire d'étudier les propriétés du sang chez un homme qui est en train de guérir d'une infection pneumococcique et, de plus, se servir à cet effet d'un sang puisé tout récemment dans les vaisseaux, et n'ayant pas encore perdu ses propriétés bactéricides, si tant est qu'il possédât ces propriétés avant. Il fallait aussi tenir compte d'un autre facteur. Le diplocoque de la pneumonie comprend, paraît-il, plusieurs variétés. Il se peut que le sang d'un animal guérissant d'une infection pneumococcique soit doué de propriétés bactéricides par rapport à l'espèce de diplocoques qui l'avaient infecté et qu'il reste indifférent par rapport à tous les autres diplocoques.

Il fallait donc, pour obvier à cet inconvénient, étudier l'influence du sang d'un pneumonique pendant la crise, précisément sur l'espèce de diplocoques qui avait déterminé la pneumonie.

J'ai institué toute une série d'expériences, dans le but de me rendre compte, si le sang d'un pneumonique acquiert, au moment où survient la crise, des propriétés bactéricides.

Les expériences furent instituées, de la façon suivante :

A l'entrée d'un pneumonique à l'hôpital, on inoculait ses crachats à une souris, ou à un lapin, qui succombaient au bout de 24 ou 48 heures à une septicémie pneumococcique. Pour les expériences on se servait : ou d'une culture de diplocoques dans du bouillon obtenue par ensemencement de ce dernier avec une goutte de sang provenant de l'animal infecté, ou, tout sim-

plement, de bouillon mélangé avec ce sang, ce dernier présentant ordinairement une culture pure de diplocoques. Je mélangeais ordinairement dans ces cas une goutte de sang avec 1-8-10 c. c. de bouillon. Lorsque les phénomènes de la crise se déclaraient chez un pneumonique, je retirais quelques gouttes de sang au niveau du lobule de l'oreille au moyen d'un petit tube en verre stérilisé, et je mélangeais aussitôt ce sang avec une quantité égale de culture de diplocoques en bouillon, ou avec un mélange de sang de souris et de bouillon, comme je viens de l'indiquer. Après avoir mélangé la culture de diplocoques avec du sang fraîchement recueilli, je fermais immédiatement le petit tube avec le mastic fondu de Mendéléev, et je le mettais à l'étuve pour des périodes de temps différentes : de 15 minutes à 14 heures. Pour avoir un terme de comparaison, on préparait aussi un mélange d'une culture de diplocoques avec du sang d'un homme sain.

Au bout d'un laps de temps, variant entre les chiffres indiqués plus haut, on sortait les petits tubes de l'étuve, et après les avoir débouchés, on injectait leur contenu sous la peau de souris blanches, et on le soumettait d'un autre côté à l'examen microscopique. Malgré cette manière de procéder, il se produisait dans les tubes, qui avaient été à l'étuve, une coagulation rapide du sang avec formation de sérum ; mais, du moins, les diplocoques pénétraient dans le sang, dès que celui-ci était retiré des vaisseaux.

Il résulte d'une série d'expériences ainsi faites, dont quelques-unes sont décrites en détail à la fin du mémoire, qu'au moment où la crise se déclare, le sang des pneumoniques ne possède pas de propriétés bactéricides,

Même après un contact prolongé avec ce sang et avec les produits de la coagulation, non seulement les diplocoques continuent à être bien vivants, mais ils conservent même leur virulence.

Les souris, inoculées avec les diplocoques provenant de ce mélange, périssent. L'examen microscopique a montré que les pneumocoques mélangés avec du sang provenant de malades atteints de pneumonie et se trouvant en voie de guérison continuent à se multiplier et se groupent souvent en chaînettes, comme on l'observe ordinairement lorsqu'on cultive les pneumocoques en bouillon.

Dans nos expériences, le nombre de diplocoques soumis à l'action du sang, a été souvent tout à fait insignifiant. Au lieu d'une culture, nous nous sommes servis parfois de 8—10 c. c. de bouillon, mélangés avec une gouttelette de sang de souris ayant succombé à la septicémie diplococcique ; on délayait, par conséquent, cette goutelette presque dans 200 fois son volume de bouillon. La gouttelette de sang ainsi délayée était mélangée ensuite avec une goutte de sang du pneumonique. De cette façon, le nombre de diplocoques, soumis à l'action du sang du pneumonique, était très petit, et, malgré cela, ce sang n'avait sur les microbes aucune influence nuisible. Nous n'avions par conséquent, aucune base pour admettre la présence dans ce sang de substances bactéricides quelconques, l'apparition de la crise ne peut donc pas être attribuée aux propriétés bactéricides du sang.

Nous avons déjà vu que M. Isaeff, dans ses recherches, conclut d'une façon absolue à la non-existence des propriétés antitoxiques dans le sérum des animaux immunisés contre le pneumocoque et ses toxines. Si même, on n'accepte pas les conclusions de Isaeff d'une façon absolue, il est en tout cas difficile d'admettre que les antitoxines jouent un rôle important au cours da la crise. Dans mes expériences, les souris infectées par le mélange d'une culture de pneumocoques et du sang pris chez le malade après la crise, succombaient souvent plus tard que celles infectées par le mélange des diplocoques et du sang provenant d'un homme normal. Le sang d'un pneumonique, en dehors de substances bactéricides et d'antitoxines, peut contenir aussi d'autres substances de défense : les stimulines et les agglutinines jouent aussi un rôle, quoique non principal, dans la défense de l'organisme.

La présence d'agglutinines dans le sang d'un pneumonique pendant la crise est établie d'une façon certaine. Ce phénomène serait tout à fait incompréhensible, si l'on faisait abstraction de la théorie phagocytaire. Par contre, en considérant la phagocytose comme le principal facteur dans la défense de l'organisme, nous pouvons comprendre facilement le rôle des agglutinines, commes substances agglutinant les diplocoques en petits amas, et facilitant ainsi aux phagocytes leur travail.

Il est aussi nécessaire d'admettre dans le sang des pneumo-

niques, à la période de la guérison, l'existence de substances stimulantes, c'est-à-dire de substances stimulant la phagocytose. Par la présence de stimulines dans le sang des individus ayant subi l'infection pneumococcique, nous pouvons nous expliquer facilement l'action préventive et curative du sérum, provenant des animaux immunisés contre le pneumocoque. On peut aussi rapporter aux stimulines les substances de défense de M. Wassermann, se formant dans la moelle des os (19).

En se basant sur ce qui précède, nous pouvons nous représenter le processus de la guérison chez un pneumonique de la façon suivante :

Les diplocoques, après avoir pénétré dans les alvéoles pulmonaires, s'y multiplient et sécrètent toute une série de toxines qui déterminent, d'un côté une réaction inflammatoire locale, et d'un autre, une réaction générale se traduisant par la fièvre. En pénétrant dans le sang, les toxines sécrétées par les pneumocoques, provoquent une affluence considérable de leucocytes des organes générateurs du sang — la leucocytose. En même temps, l'organisme commence à fabriquer des stimulines et des agglutinines. Dans les poumons, le travail de la phagocytose devient de plus en plus énergique. Par suite de l'absence, ou de la fabrication insuffisante d'antitoxines, les phénomènes de l'intoxication sont très prononcés jusqu'à l'apparition de la crise : le malade a une forte fièvre, du délire ; souvent l'urine contient de l'albumine. L'intoxication est encore aggravée par cette circonstance que les reins malades éliminent mal les produits toxiques. D'après MM. Roger et Gaume, l'urine des pneumoniques est moins toxique avant la crise qu'après.

Cet état dure jusqu'au moment où la plus grande partie des diplocoques sont englobés par les phagocytes. A partir de ce moment, le sang cesse d'être envahi par les toxines pneumococciques, l'hyperthermie fébrile, ainsi que l'afflux des leucocytes venant des organes hémopoiétiques cessent également.

Parmi les différentes espèces de leucocytes, ce sont les neutrophiles polynucléaires qui jouent le principal rôle dans l'englobement des diplocoques; et ce sont justement ces leucocytes dont le nombre diminue d'une façon particulière pendant et après la crise. On a essayé d'expliquer ce phénomène par la destruction de leucocytes polynucléaires, mais jusqu'à présent,

personne n'a fourni de preuves de l'exactitude d'une pareille explication.

La destruction des leucocytes a toujours lieu dans une certaine mesure ; pendant la leucocytose, cette destruction est plus prononcée, mais il n'est point possible d'attribuer à la destruction seule la diminution énorme du nombre des leucocytes pendant la crise, et il faut supposer que la diminution de l'afflux de ces éléments dans le sang joue aussi un certain rôle. Si l'empoisonnement du sang par les toxines des pneumocoques cesse, et qu'en même temps augmente l'élimination de ces toxines par les reins, la chute critique de la température s'explique très bien.

La question se pose maintenant de savoir s'il existe des faits permettant d'affirmer que le sang après la crise devient moins toxique?

Déjà, en 1887, Lucatello (20) affirmait que le sérum des pneumoniques fébricitants, injecté sous la peau des animaux, provoque chez ces derniers une élévation de température, tandis que le sérum des pneumoniques en voie de guérison ne produit aucun effet sensible.

J'ai procédé personnellement à trois expériences de ce genre. J'ai introduit dans les veines de lapins du sang de pneumoniques, pris avant et immédiatement après la crise, et mélangé avec 10 fois son volume de solution physiologique. Dans deux de ces expériences, le résultat obtenu a été très net : le sang pris avant la crise a déterminé une élévation de température plus grande que celui pris après la crise. Dans la 3e expérience, la différence a été insignifiante. Je ne pouvais, du reste, pas m'attendre à une très grande différence, étant donnée la quantité minime de sang que je me permettais de prendre chez le malade.

De cette façon, l'hypothèse de la diminution de la toxicité du sang au moment de la crise, se trouve être confirmée par mes expériences.

Il est vrai que ce phénomène admet aussi une autre explication : la diminution de la toxicité du sang peut résulter de la neutralisation des poisons par les antitoxines. Mais nous avons déjà vu que, chez les animaux ayant subi l'infection pneumococcique, le sang n'est pas antitoxique. En se basant sur ces

données expérimentales, il est difficile d'admettre que les antitoxines jouent, chez l'homme, un rôle essentiel dans les phénomènes de la crise.

A la suite de l'englobement des diplocoques par les phagocytes et la disparition de l'intoxication, le processus inflammatoire, localisé dans les poumons, marche rapidement vers la résolution.

En faisant le bilan de tout ce qui précède, nous pouvons formuler nos conclusions de la façon suivante :

1° Déjà, dans nos recherches précédentes nous avons établi, que chez les animaux ayant subi une infection pneumococcique et étant en voie de guérison, il existe une leucocytose et un englobement très énergique des diplocoques par les phagocytes ; par contre, dans l'infection mortelle, déterminée par des diplocoques virulents, le nombre de phagocytes dans le sang diminue et la phagocytose n'apparaît pas ;

2° Mes expériences ultérieures prouvent que *la crise chez un pneumonique ne peut être expliquée par les propriétés bactéricides des humeurs de l'organisme, vu qu'il est possible de retirer, même après la crise, des diplocoques vivants et virulents, en ponctionnant le poumon malade;* on peut constater, en outre, que *le sang du pneumonique, pendant, ou après la crise, n'est pas bactéricide pour les diplocoques provenant du même malade, arrivé au point culminant de la maladie ;*

3° Vu qu'il est difficile d'admettre, en se basant sur les expériences de M. Isæff effectuées sous la direction de M. le professeur Metchnikoff, que le sang provenant d'un pneumonique en voie de guérison, possède des propriétés antitoxiques énergiques, on est obligé de reconnaître, que la phagocytose est le principal facteur dans le processus de la guérison.

La phagocytose a lieu dans ces cas d'une façon plus énergique, grâce à l'apparition dans le sang des stimulines.

La crise s'explique par l'englobement, dans les poumons, de la plus grande partie des diplocoques par les phagocytes. Les expériences de Lucatello et les miennes, montrant que le sang des pneumoniques possède, avant la crise, des propriétés pyrogènes plus grandes qu'après la crise, confirment cette manière de voir ;

4° Les agglutinines, les antitoxines et les autres substances

de défense, ne jouent, paraît-il, qu'un rôle secondaire et auxiliaire dans la défense de l'organisme contre l'infection pneumococcique.

SUPPLÉMENT

Tout récemment a paru un travail extrêmement intéressant du Dr Gousseff[1], fait dans le laboratoire du professeur Savtchenko. On sait que l'étude du mécanisme de la bactériolyse a montré que les substances bactéricides se composent de deux agents : de l'alexine ou la cytase, préexistant dans le sang des animaux normaux, et du fixateur, apparaissant lors de l'immunisation de l'animal. Le Dr Gousseff a cherché à déterminer la quantité d'alexines ou de cytases, contenues dans le sang des pneumoniques, avant et après la crise. Les recherches de cet auteur n'avaient pas pour objet, à proprement parler, l'action bactériolytique du sérum des pneumoniques; il cherchait surtout à étudier les propriétés hémolytiques de ce sérum, en prenant pour point de départ l'identité des hémocytases et des bactériocytases.

En se basant sur ses recherches, le Dr Gousseff formule les conclusions suivantes :

1° La quantité d'alexines dans le sang augmente au cours de la pneumonie et atteint le maximum au moment où la maladie commence à marcher vers la résolution;

2° Après la résolution, la quantité d'alexines diminue d'une façon plus ou moins brusque, suivant le caractère de cette résolution (crise ou lysis) ;

3° La quantité d'alexines, après cette diminution, reste stationnaire ou augmente;

4° Dans les cas graves, avec issue mortelle, on n'observe pas d'augmentation de la quantité d'alexines.

D'après les observations de l'auteur, la numération des globules blancs montrait, d'une façon générale, des oscillations dans le nombre de leucocytes, lesquelles correspondaient aux oscillations dans la quantité d'alexines, mais sans qu'il y ait eu un parallélisme complet; l'auteur est arrivé à la conclusion, que la quantité d'alexines ne dépend pas du nombre total de leucocytes.

1. F. A. Gousseff, *Contribution à la question du dosage des alexines contenues dans le sérum de l'homme sain et malade*, Kazan, Thèse 1902.

Ces recherches intéressantes ne peuvent pas changer notre manière de voir en ce qui concerne les causes de la crise. Avant tout, ces recherches se rapportent au sérum des pneumoniques. Or, lors de l'obtention de ce sérum, il y a toutes les conditions nécessaires pour la mise en liberté des cytases des leucocytes avariés; c'est surtout vrai chez les pneumoniques, dont le sang, par suite d'une leucocytose considérable, contient toujours un grand nombre de leucocytes en voie de destruction.

Le travail du D[r] Gousseff nous montre, en outre, que la quantité d'alexines est d'autant plus grande que la leucocytose est plus forte. Quand même les chiffres du D[r] Gousseff se rapporteraient à un sang vivant, et non à du sérum, il aurait fallu encore prouver que ces mêmes alexines possèdent la propriété de dissoudre les diplocoques. Il aurait fallu, enfin, déterminer dans le sang des pneumoniques la quantité du deuxième et principal élément, indispensable pour la bactériolyse — le fixateur.

Ne possédant pas pour le moment ces données, nous ne pouvons pas faire une appréciation juste du travail du D[r] Gousseff.

APPENDICE

Expérience V. — Malade F., atteint de pneumonie fibrineuse gauche. Défervescence dans la nuit du 28 mai 1897. Matité et souffle tubaire au-dessous de l'omoplate gauche. On retire par ponction, dans la région de la matité, 2 gouttes de liquide sanguinolent, et après les avoir mélangées avec 1 c. c. de bouillon, on injecte ce mélange sous la peau d'un lapin. Vers le soir, la température du malade s'élève de nouveau à 39°. La crise définitive n'a lieu que dans la nuit du 31. Dans la matinée du 31, on pratique une deuxième ponction, et le liquide sanguinolent extrait du poumon est injecté sous la peau d'un autre lapin. Les deux lapins succombent à la septicémie diplococcique.

Expérience III. — Malade A. R., atteint de pneumonie fibrineuse double. La crise a lieu le 20 mai. Dans la matinée du 21, on retire du lobule de l'oreille, avec toutes les précautions aseptiques, une goutte de sang, et on la mélange avec une goutte de culture de diplocoques en bouillon, vieille de 24 heures. Le mélange, renfermé dans un petit tube en verre, est placé dans

l'étuve. On procède de la même façon avec une goutte de sang retirée de mon oreille. 15 minutes après, on sort les tubes de l'étuve, et on fait des ensemencements avec chacun de ces deux mélanges en bouillon. Le 22 mai, on constate dans les tubes une culture de diplocoques. On injecte 1 c. c. de chacune de ces cultures sous la peau d'un lapin. Les deux lapins périssent l'un, le 24, dans la journée ; l'autre dans la nuit du 25.

Expérience X. — Malade N. S., âgé de 21 ans, atteint de pneumonie fibrineuse droite. Entré à l'hôpital le 12 décembre 1903, au 6e jour de la maladie. Une souris blanche, à laquelle on inocule les crachats du malade, expire le lendemain matin. Le 12, on mélange une goutte de sang de cette souris, contenant des diplocoques, avec 1 c. c. de bouillon. Dans la nuit du 11 au 12, il y a eu défervescence : la température du malade tombe de 39°,9 à 37°. Le matin, on retire du lobule de l'oreille 2 gouttes de sang que l'on fait couler dans un petit tube en verre, de 3 millimètres de diamètre, et après y avoir ajouté une goutte de mélange de sang de souris avec du bouillon, mélange dont il a été question plus haut, on ferme le petit tube avec le mastic fondu de Mendeleeff, et on le met à l'étuve. Dans un autre tube, plus grand et enduit intérieurement d'une couche de paraffine, on introduit 2 gouttes de sang du même pneumonique, 1 goutte de mélange de bouillon avec du sang de souris renfermant des diplocoques, et on y ajoute en outre 2 c. c. de bouillon. Après avoir bien mélangé toutes ces substances, on ferme ce tube avec un bouchon d'ouate stérilisée, et on le met également à l'étuve. 4 heures après, on sort de l'étuve les deux tubes, et on divise le contenu du premier en deux parties égales, qu'on injecte à deux souris sous la peau. A une troisième souris on injecte 1/2 c. c. du contenu du deuxième tube. La première et la troisième souris expirent le soir du 14; la deuxième, le 15. Chez toutes les trois on constate la présence des diplocoques dans le sang.

Expérience VIII. — Malade F. N., atteint de pneumonie fibrineuse droite. Le matin du 14 novembre 1903, après la défervescence qui eut lieu dans la nuit, on retire de l'oreille une goutte de sang, et on la mélange avec une goutte de culture de diplocoques de 24 heures en bouillon (préparée par l'ensemencement du sang d'une souris qui a été inoculée par les crachats du malade). Le mélange, renfermé dans un petit tube en verre soudé, est placé 20 minutes à l'étuve, et injecté, ensuite, à 2 souris, sous la peau. Le lendemain, on trouve les deux souris mortes. Leur sang contient un nombre considérable de diplocoques.

Expérience XI. — Malade N. D. Entré à l'hôpital le 16 décembre, le 5e jour de la maladie. La crise a lieu dans la nuit du 17. A midi, on mélange dans un petit tube en verre 2 gouttes de sang de ce malade avec 2 gouttes de culture de diplocoques en bouillon, de 24 heures. Le tube est fermé avec le mastic fondu de Mendeleeff, et placé 2 h. 1/2 dans le thermostat. On injecte ensuite le coagulum, ainsi que le liquide qui s'en est séparé, sous la peau d'une souris. La souris meurt dans la nuit du 19 de septicémie diplococcique.

Expérience XIII. — Malade B. G., âgé de 36 ans; atteint de pneumonie fibrineuse gauche; entré à l'hôpital au 5e jour de la maladie, le 17 décembre. Le matin du 18, on inocule à une souris blanche les crachats du malade. La

souris meurt le 19, le matin. Son sang renferme une culture pure de diplocoques. La crise se déclare chez le pneumonique dans la nuit du 19, et, vers le matin, la température tombe à 37°. A 11 heures du matin, on ensemence, dans un tube contenant 8 c. c. de bouillon, une goutte de sang de la souris, et on met le tube à l'étuve. A 1 h. 45, on prélève chez le pneumonique une goutte de sang et on la mélange, dans un petit tube en verre, avec une quantité égale de bouillon, ensemencé avec les diplocoques de la souris. Le petit tube, après avoir été scellé, est mis à l'étuve pendant 5 heures. Dans un autre petit tube on prépare le même mélange avec mon propre sang. 5 heures après on sort les deux petits tubes de l'étuve, et on injecte le contenu de chacun d'eux sous la peau d'une souris. La souris à laquelle on injecte le mélange de mon sang avec la culture meurt, tandis que celle à laquelle on a injecté le mélange fait avec le sang du pneumonique reste vivante. Dans ce cas, le résultat négatif est dû, peut-être, au nombre extrêmement petit de diplocoques présents dans le mélange (1 goutte de sang de souris pour 8 c. c. de bouillon).

Expérience XIV. — Malade J. S., âgé de 45 ans; entré à l'hôpital le 20 décembre 1903, le 5e jour de la maladie, pour une pneumonie fibrineuse droite. Inoculation d'une souris avec les crachats du malade. Dans la nuit du 23, crise. A 11 h. 45, on mélange 0,2 c. c. de sang du malade avec une quantité égale de bouillon, dans lequel on a introduit une goutte de sang renfermant des diplocoques, et provenant de la souris morte (pour une goutte de sang de souris on a pris 9 c. c. de bouillon). Le petit tube, fermé avec le mastic de Mendeleeff, est placé 5 heures à l'étuve, et tout son contenu (coagulum et liquide) est ensuite injecté sous la peau d'une souris. La souris meurt dans la nuit du 25. Son sang renferme des diplocoques.

Expérience XV. — Malade A. R., âgé de 10 ans. Pneumonie fibrineuse gauche. Entré à l'hôpital le 26 décembre 1903. Souris inoculée avec les crachats du malade, meurt le 29. Son sang renferme un grand nombre de diplocoques.

Dans la matinée du 29, la température tombe, chez le pneumonique, à la normale. Le même jour, à 7 heures 1/2 du soir, on mélange le sang du malade avec une quantité égale d'émulsion, obtenue par dilution (1 goutte de sang pour 10 c. c. de bouillon). Le petit tube renfermant ce mélange est bouché comme précédemment, et placé dans le thermostat. On procède de la même façon avec une autre portion de la même émulsion de diplocoques, mais on remplace le sang du pneumonique par celui d'un homme normal. Après avoir placé les deux petits tubes à l'étuve pendant 14 heures, on injecte leur contenu sous la peau de deux souris. On fait, en outre, des frottis avec le contenu des deux tubes.

On constate alors que dans les deux tubes les diplocoques se sont développés en grand nombre. Les deux souris meurent : la première, celle qui a été inoculée avec le mélange contenant du sang du pneumonique, meurt dans la nuit du 31; la deuxième, la souris témoin, le lendemain matin (le 31). Le sang de toutes les deux contient un grand nombre de diplocoques.

Expérience VII. — Chez le pneumonique F. P., la veille de la crise (le 13 novembre 1903), on aspire un peu de sang dans plusieurs mélangeurs

stérilisés de Potin, et on dilue ce sang dans 10 fois son volume de solution physiologique.

Au lapin nº 1, de 1,800 grammes, on injecte dans la veine 0,08 c. c. environ de ce mélange. Le lendemain, après la crise qui s'est déclarée dans la nuit, on procède de la même façon, et on injecte le mélange au lapin nº 2, 1.420 grammes.

LAPIN Nº 1

13 novembre.	Midi, temp. avant l'injection	38,3
	Après l'injection.	
—	1 heure de l'après-midi, temp	39,3
—	6 heures du soir, temp	38,6
14 novembre.	10 heures du matin, temp	38,5
—	Midi, temp	38,3
—	5 h. 1/2 du soir, temp	38,8
15 novembre.	9 heures du matin, temp	38,4

LAPIN Nº 2

14 novembre.	Avant l'injection, temp	38,3
	Injection à midi.	
—	1 heure, temp	38,7
—	1 h. 50, temp	38,9
—	5 h. 1/2, temp	38,7
15 novembre.	9 heures du matin, temp	38,3
—	6 heures du soir, temp	38,9
16 novembre.	10 heures du matin, temp	38,6

Expérience IX. — 6 octobre. Chez un pneumonique, on retire du sang le 6e jour de la maladie (température 40°), et, après l'avoir dilué dans 10 fois son volume de solution physiologique, on injecte 1 c. c. de ce mélange dans la veine du lapin nº 1, 1,235 grammes.

Dans la nuit du 11, se déclare la crise. Le matin, on prélève de nouveau un peu de sang chez le malade, et, après l'avoir dilué dans la même quantité de solution physiologique, on injecte le mélange ainsi obtenu dans la veine du lapin nº 2, 1,260 grammes.

LAPIN Nº 1

6 octobre.	Avant l'injection, temp	38,2
	Injection à 3 heures.	
—	4 h. 10, temp	39,5
—	6 heures du soir, temp	39,0
7 octobre.	9 heures du matin, temp	38,7
—	6 heures du soir, temp	38,7
8 octobre.	9 heures du matin, temp	39,0
—	6 heures du soir, temp	38,8
9 octobre.	9 heures du matin, temp	38,7
—	6 heures du soir, temp	38,7

LAPIN Nº 2

11 octobre.	Avant l'injection, temp	38,7
	Injection à 1 h. 20.	
—	2 h. 20, temp	38,8
—	9 heures du soir, temp	38,6

12 octobre.	9 heures du matin, temp	38,6
—	6 heures du soir, temp	38,7
13 octobre.	9 heures du matin, temp	38,5
—	6 heures du soir, temp	38,6

Dans l'*expérience XVI*, faite de la même façon, l'injection de sang précritique a produit chez le lapin nº 1 une élévation de température de 38º2 à 39º,3 (au bout de 1 h. 1/2) ; chez le lapin nº 2 qui avait été injecté dans les mêmes conditions, avec du sang prélevé après la crise, la température s'élèvera de 38º,2 à 39º,2.

BIBLIOGRAPHIE

1) Gamaleia, *Annales de l'Institut Pasteur*, nº 8, 1888.

2) N. Tchistowitch, *Annales de l'Institut Pasteur* et *Gazette des hôpitaux de Botkine*, 1890.

3) B. Scheube, *Archiv. de Heilkunde*, 1876, s. 185-207.

4) N. Tchistowitch, De la métamorphose azotée dans la pneumonie. (*Gazette clinique hebdomad. de Botkine*, 1886.)

5) Abramowitch, De la métamorphose azotée dans la pneumonie. (*Thèse de Saint-Pétersb.*, 1888.)

6) Roger et Gaume, Toxicité de l'urine dans la pneumonie. (*Revue de médecine*, 1889.)

7) Hayem, *Du sang*, Paris, 1889.

8) Kikodze, Anatomie pathologique du sang dans la pneumonie. (*Thèse*, 1820.)

9) V. Patella, Ricerche batteriologische sullo polminite. (*Attr. d. R. Academia di Roma*, 1888-1889, vol. IV, série 11.)

10) N. Tchistowitch, Études sur la pneumonie fibrineuse. (1er mém. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890.)

11) N. Tchistowitch, Études sur la pneumonie fibrineuse. (2e mém. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891.)

12) Besredka, Du rôle des leucocytes dans l'intoxication par un composé arsenical. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, p. 209.)

13) N. Tchistowitch, Contribution à l'étude de la pneumonie. Des modifications du nombre de globules blancs au cours de la pneumonie. (*Gazette des hôpitaux de Botkine*, 1891.)

14) N. Tchistowitch, Contribution à l'étiologie de la pneumonie. Le sort de microbes et le rôle de la phagocytose au cours de la pneumonie. (*Gazette des hôpitaux de Botkine*, 1820.)

15) Foa u. Carbone, *Gazzetta medica di Torino*. Ann. XLII.

16) Emmerich et Favitzki, *Munchener med. Woche*, 1891, nº 32.

17) Foa u. Pio, Résumé. (*Centralbl. f. Bakt.*, 1896, Bd. XIX.)

18) Kruse und Pansini, *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. XI, 1892, s. 273.

19) M. Wassermann, Pneumokokkenschutzstoffe, *Deutsche medic. Woche*, nº 9, 1899.

20) Emmerich, *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. XVII, 1894, s. 412.

21) Behring und Nissen, *Zeitschr. f. Hygiene*, 1890, s. 412.

22) G. u. F. Klemperer, *Berl. Klin. Woche*, 1891, nº 12.

23) Isaeff, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, p. 260.

24) Pane, *Centralbl. f. Bakter*, Bd. XXI, 1897, nºs 17 u. 18.

25) Bezançon et Griffon, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900.

26) Neufeld, *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. XL, 1902, s. 54.

27) Mennes, *Zeitschrift f. Hygiene*, Bd. XXL, 1897, s. 413.

28) Mosny, *Archives de Med. expérim.*, 1892, nº 2.

29) Lucatello, *Archiv. italiennes de biologie*, m. IX, 1888, p. 30.

30) Gousseff, *Thèse*, Russie. Kazan, 1902.

Un cas d'appendicite chez le chimpanzé

Par le Dr M. WEINBERG

Avec la planche III.

(Laboratoire de M. Metchnikoff)

Une jeune femelle de chimpanzé envoyée du Congo français à l'Institut Pasteur pour servir aux recherches sur la syphilis expérimentale est morte avant toute inoculation de produits syphilitiques à la suite d'une maladie de quelques jours. Elle était devenue triste, avait perdu l'appétit et était atteinte de constipation opiniâtre. Le quatrième jour, on lui administra de l'huile de ricin, sans résultat. Le lendemain l'animal fut trouvé mort dans sa cage.

Voici le résumé de l'autopsie et de l'étude microscopique de ce cas.

A l'ouverture de la cavité abdominale, on trouve que l'appendie, long de 15 centimètres, est sans adhérences ; il est augmenté de volume dans les trois derniers centimètres de son extrémité libre. A ce niveau, il est très congestionné et recouvert de minces membranes fibrineuses. Le reste de l'appendice est lisse et d'aspect normal. On trouve un paquet de ganglions volumineux dans l'angle cœco-appendiculaire. L'appendice ouvert suivant son grand axe, on constate que sa muqueuse, d'aspect grisâtre, est largement ulcérée et présente des placards nécrotiques. Au-dessus de la région malade, la muqueuse de l'appendice est légèrement congestionnée, mais ne présente pas de lésions à l'œil nu.

L'autopsie complète de cet animal montre qu'un certain nombre de plaques de Peyer sont hypertrophiées et que quelques-unes d'entre elles présentent même des ulcérations. Les ganglions mésentériques sont également un peu hypertrophiés. L'intestin grêle contient un nombre considérable de lombrics dans toute sa longueur. Trois autres lombrics se trouvent dans le cœcum.

L'examen de tous les autres organes n'a rien révélé de spécial, si ce n'est que la rate est un peu hypertrophiée.

Le sang du cœur a été ensemencé dans du bouillon et sur de la gélose sanglante, sans résultat.

A l'examen histologique de l'appendice, on est frappé par des lésions nécrotiques et par des lésions hémorragiques.

La muqueuse présente une petite série d'ulcérations et manque même complètement dans un point de la préparation où la nécrose a envahi toute la région folliculaire de la sous-muqueuse. Dans un autre endroit, le processus nécrobiotique a envahi, sur une faible largeur, toutes les couches de l'appendice et ne s'est arrêté que tout à fait sous le péritoine ; de telle sorte que, si la maladie avait duré un peu plus de temps, nous aurions pu assister à la perforation de l'appendice. Les follicules lymphatiques sont hypertrophiés et réunis les uns aux autres par des bandes d'infiltration inflammatoire. Des foyers hémorragiques intra et extrafolliculaires parsèment la préparation. Les deux couches musculaires et la couche sous-péritonéale sont dissociées par des leucocytes, polynucléaires pour la plupart. Les vaisseaux sont à ce niveau gorgés de sang. Le péritoine est épaissi et recouvert de fausses membranes riches en leucocytes. L'examen bactériologique a décelé la présence de bacilles ne prenant pas le Gram, surtout dans la muqueuse et dans les fausses membranes fibrineuses; on les trouve isolés ou bien disposés en petits amas.

Les ulcérations des plaques de Peyer présentent les mêmes caractères que les lésions beaucoup plus étendues de l'appendice. Ici aussi, on trouve des foyers d'apoplexie et des placards de nécrose superficielle.

S'il est probable que les lésions de l'appendice et de l'intestin grêle sont de même nature, il est évident que c'est surtout l'appendicite qui a été la lésion prédominante et qui a occasionné la mort du singe.

Bien que les lésions intestinales, par leur aspect et leur disposition, ressemblent un peu à des lésions typhiques, nous ne croyons pas que cet animal soit mort de la fièvre typhoïde, car, depuis son arrivée à l'Institut Pasteur, il a été enfermé dans une cage désinfectée et nourri exclusivement de lait, de riz bouillis et de fruits cuits. D'autre part, l'ensemencement de son

sang, fait dans de bonnes conditions, n'a pas donné de résultat.

Il s'agit donc d'une appendicite aiguë hémorragique compliquée de quelques lésions de l'intestin grêle.

***

A part l'intérêt que présente cette observation comme premier cas d'appendicite observée chez les singes, nous voudrions insister sur quelques considérations d'ordre étiologique qu'elle nous inspire.

L'appendicite est incontestablement une maladie microbienne. Les recherches bactériologiques concernant cette question n'ont pas encore dit leur dernier mot. M. Metchnikoff pense[1] qu'au début de l'appendicite le rôle principal est joué par des aérobies qui cèdent ensuite le pas aux microbes anaérobies. En effet, après plusieurs auteurs qui, dans les appendices malades, ont trouvé surtout le streptocoque, le coli, le pneumocoque, etc., Veillon et Zuber[2] ont pu isoler 7 espèces d'anaérobies dans différents cas d'appendicite gangréneuse.

Tavel et Lanz[3] ont communiqué au dernier Congrès de l'Association française de chirurgie les résultats de leurs recherches bactériologiques dans 130 cas d'appendicite. Ils ont étudié comparativement la flore appendiculaire normale et pathologique. Cette flore, d'ordinaire polymicrobienne, n'était représentée dans un cas sur dix que par le coli. Dans 10 0/0 d'appendicites, la cavité de l'appendice a été stérile. En général, la flore de l'appendice inflammé est la même que celle de l'appendice normal, mais on y trouve moins d'espèces.

Il est évident que dans certains cas, comme dans la tuberculose pulmonaire, par exemple, le microbe pathogène peut être apporté dans la paroi appendiculaire par la voie sanguine ou lymphatique et y provoquer un processus inflammatoire. Mais, en général, le microbe ou les microbes de l'appendicite viennent de la cavité même de l'appendice.

Pour que le microbe pénètre dans l'appendice, il faut

1. Prof. I. Metschnikoff. Einige Bemerkungen über die Entzündung des Wurmfortsatzes. *Internationale Beitrage zur inneren Medecin.* Erster Band, p. 428.

2. *Archives de méd. expérimentale*, 1878, p. 535.

3. *Presse médicale*, 1903. N° 91, p. 793.

qu'il trouve une porte d'entrée, une brèche ouverte dans la barrière épithéliale de la muqueuse appendiculaire.

Il y a déjà longtemps que l'attention des médecins a été attirée sur la présence, dans la cavité de l'appendice malade, de corps étrangers, comme calculs stercoraux, pépins, poils, os de poisson, etc. Notre ami le Dr Marien (de Montréal) nous a envoyé un appendice opéré par lui, dans lequel il a trouvé un petit clou métallique à extrémité très aigüe. A l'examen histologique de cet appendice, nous avons constaté des lésions inflammatoires très nettes. Il est certain que ce clou a été un facteur important dans la genèse de cette appendicite.

Il y a environ trois ans, M. Metchnikoff[1], se basant sur quelques observations personnelles, a émis l'hypothèse que les nématodes doivent jouer un grand rôle dans l'étiologie de l'appendicite. Il a incriminé surtout le trichocéphale. En effet, ce ver, très mobile, est très fréquemment l'hôte du cæcum d'où il pénètre très facilement dans la cavité de l'appendice. Non seulement il pénètre dans l'appendice, mais il blesse sa muqueuse qu'il embroche par son extrémité céphalique. Girard[2] a étudié un appendice contenant un trichocéphale dont la partie effilée avait pénétré dans la muqueuse appendiculaire. Il a constaté dans l'épaisseur de la muqueuse, autour de la coupe transversale du trichocéphale la présence de nombreux microbes et de leucocytes. Nous-mêmes avons pu constater la façon dont le trichocéphale embroche la muqueuse de l'appendice ou celle du cœcum. Il perfore le revêtement épithélial, pénètre en crochet dans le chorion pour ressortir après avoir perforé dans un autre point la couche épithéliale.

L'hypothèse de M. Metchnikoff a d'abord rencontré un certain scepticisme parmi les chirurgiens. Et cependant, les observations antérieures de certains chirurgiens avaient déjà apporté quelques documents à l'appui de cette idée. Ainsi Brun[3] a trouvé un ascaride logé dans l'abcès rétroappendiculaire dans un cas d'appendicite perforante. Guinard[4] a signalé le trichocéphale vivant, dans un cas d'appendicite opéré par lui.

1. *Bulletin de l'Académie de médecine*. 1901, p. 301.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1901, p. 440.
3. *Bulletin et mémoires de la Société de chirurgie*. Paris 1900, p. 311.
4. *Bull. et mémoire de la Société de chirurgie*. Paris 1900, p. 1009.

Plus récemment, Kirmisson [1] et Delsnitz [2], dans les matières fécales des malades, ont trouvé des trichocéphales dans 18 cas sur 22. Depuis sa communication de 1901, M. Metchnikoff a retrouvé le trichocéphale dans 12 cas sur 17, ainsi qu'il l'a signalé dans son nouveau travail. Enfin, de nombreuses et plus récentes observations lui ont permis de faire la même constatation.

D'autres espèces de vers intestinaux peuvent être trouvés dans les matières fécales des malades atteints d'appendicite. M. Metchnikoff a déjà noté l'association du trichocéphale et du lombric dans ses premières observations. Triboulet [3] a publié un cas d'appendicite dû à l'ascaride lombricoïde.

Le docteur Guiart, agrégé de la Faculté de Paris, nous a communiqué la note suivante :

« Sur quatre cas d'appendicite où j'ai eu l'occasion d'examiner les matières fécales, deux fois je n'ai pas trouvé d'œufs d'Helminthes et j'ai laissé opérer. Dans les deux autres cas, j'ai trouvé dans l'un des œufs de trichocéphale et dans l'autre des œufs d'ascaris. Il s'agissait d'appendicite à répétition chez des jeunes filles; la guérison a été immédiate à la suite d'administration de thymol dans un cas, de santonine dans l'autre. La guérison s'est maintenue ; le premier cas remonte à 3 ans environ et le second à 4 mois. »

Lorsque l'examen des matières fécales est négatif, il ne faut pas conclure à l'absence des vers, car l'intestin peut ne contenir que des lombrics mâles, comme l'a vu M. Metchnikoff dans un cas d'appendicite cité par lui dans son travail.

En Allemagne, Schiller [4] a réuni dans un mémoire tous les faits qui ont trait aux troubles de l'appareil digestif, dans lesquels on peut incriminer les parasites de l'intestin. Il a apporté cinq nouveaux cas d'appendicite où l'on a trouvé tantôt l'ascaride (un cas), tantôt le trichocéphale (un cas), tantôt l'association de ces deux parasites (un cas), tantôt enfin des oxyures (deux cas). Dans l'un de ces cas il s'agit d'un enfant de six ans atteint d'appendicite et dans les matières fécales duquel on a trouvé des œufs

1. *Bull. et mémoires de la Soc. de chirurgie.* 1901, p. 1065.
2. *Rousski Wrateh* 1901. n° 1, p. 4. (en russe).
3. *Société médicale des hopitaux.* 1902.
4. *Beitrage zur Klinischen Chirurgie.* 1902, p. 197-222.

de lombric et de trichocéphale. Le traitement vermifuge a été suivi de l'expulsion des vers et l'enfant a guéri sans intervention chirurgicale. Deux autres cas se rapportent, l'un à une appendicite tuberculeuse, l'autre à une appendicite actinomycosique. L'auteur croit que les vers trouvés dans ces appendices ont, en blessant la muqueuse, favorisé la pénétration dans son épaisseur du bacille de Koch et de l'actinomycète.

La littérature médicale compte également un grand nombre d'observations qui montrent le rôle actif joué par l'oxyure à l'origine de certains cas d'appendicite.

En Angleterre, Still [1] a trouvé 38 fois ce parasite dans 200 autopsies pratiquées sur des enfants au-dessous de 12 ans. Dans 25 cas, il a constaté la présence des oxyures dans l'intérieur de l'appendice. Dans 6 de ces cas, les oxyures se trouvaient uniquement dans l'appendice; dans les 19 autres, il y en avait également dans le cœcum et le côlon. Le même auteur a retrouvé 111 oxyures dans un appendice présentant des lésions inflammatoires très nettes.

Moty [2] a trouvé des oxyures dans plusieurs appendices réséqués par lui. Markovitine [3] en a trouvé 16 vivants dans un cas d'appendicite où l'examen des matières fécales avait été négatif.

Nous avons déjà dit plus haut que parmi les 5 nouveaux cas de Schiller il y en avait deux avec oxyures. Après lui, Ramstedt [4] a trouvé des oxyures dans un cas d'appendicite. Dans ce cas, l'appendice présentait de légères adhérences.

Oppe [5] a étudié un appendice provenant de l'autopsie et 60 autres enlevés chirurgicalement. Il a trouvé des oxyures 6 fois. Un de ces cas est particulièrement intéressant, car l'auteur a trouvé, à côté des oxyures femelles, des œufs de ce parasite au milieu du pus logé à l'extrémité de l'appendice. Or, on croit en général que l'oxyure ne dépose pas ses œufs dans le canal intestinal, car on n'en trouve pas à l'examen des matières fécales.

Bruno Galli-Valerio [6] a observé un cas d'appendicite dû à l'association des oxyures et de trichocéphale.

1. *British Med. Journal*, 1899, p. 898.
2. *Bull. de l'Académie de Médecine*, 1901, p. 471.
3. *La Chirurgie* (en russie), juillet 1901, p. 34.
4. *Deutsche Med. Wochen*, 1902, p. 919.
5. *Münchener Med. Woch.*, 1903, p. 859-861.
6. Analysé par *Münchener. Med. Woch.* 1903, p. 1434.

Enfin, A. Martin, dans une communication faite le 29 juillet 1903 à la Société de chirurgie, relate le cas d'une jeune fille de 23 ans opérée à sa troisième crise. Dans son appendice réséqué, le chirurgien a trouvé deux anneaux de *Tænia saginata* et trois oxyures.

Bien que le nombre d'observations en faveur du rôle joué par les vers intestinaux dans l'origine de certains cas d'appendicite ait notablement augmenté depuis la première communication de M. Metchnikoff, certains cliniciens sont restés sceptiques. Ainsi Sevestre[1] voudrait que le trichocéphale fût trouvé dans la majorité si ce n'est dans tous les cas d'appendicite, pour avoir la certitude que ce ver peut être pour quelque chose dans l'étiologie de cette affection : mais il faut remarquer que M. Metchnikoff n'a pas affirmé que tous les cas d'appendicite sont dus au trichocéphale. Il pense qu'on doit incriminer les vers intestinaux dans un grand nombre de cas mais non pas dans tous.

Pour que l'appendicite soit déterminée par la présence des vers intestinaux, il faut deux conditions : éraillure de la paroi intestinale et pénétration des microbes virulents dans l'épaisseur de la muqueuse. Les vers, comme le trichocéphale, embrochent la muqueuse. Cela est incontestable. Quant à la deuxième condition, elle peut ne pas se réaliser. En effet, les microbes qui ont pénétré par la brèche de la muqueuse ne sont pas nécessairement virulents et peuvent être détruits par les appareils lymphatiques extrêmement riches de la muqueuse appendiculaire.

Voilà pourquoi la présence du trichocéphale, tout en présentant de graves dangers pour l'individu, n'est pas nécessairement suivie de lésions de l'appendice ou du cœcum.

Nous croyons que le cas d'appendicite observée par nous chez le singe parle en faveur du rôle important joué par les vers intestinaux dans les atteintes portées à l'appendice et aux autres parties de l'intestin. L'intestin grêle de ce chimpanzé était littéralement bourré de lombrics; le cæcum en contenait également trois. Et nous savons que le lombric peut parfaitement pénétrer dans l'appendice. Sans parler du cas de Brun cité plus haut et des cas plus anciens encore de Becquerel, de Davaine, de Natale cités par M. Metchnikoff dans sa communication à l'Académie de

1. *Presse Médicale*. 1901, p. 195.

Médecine et qui tous mentionnent le passage d'un grand nombre d'ascarides dans la cavité péritonéale à travers l'appendice perforé, rappelons que M. Cantas a publié dans la *Presse Médicale*[1] l'observation d'un appendice complètement oblitéré par un lombric dont la partie céphalique était libre dans le cœcum.

Les vers intestinaux jouent ainsi un rôle incontestable dans l'étiologie de l'appendicite et certainement dans celle de certaines lésions de l'intestin. Il faut incriminer surtout les légumes, les fruits, les crudités en général, ainsi que l'eau non bouillie, véhicules habituels des œufs de ces parasites.

On a donc tort de considérer le régime carné comme facteur important dans l'éclosion de l'appendicite, ainsi que l'a fait encore récemment D. Cuziner[2] dans sa thèse inaugurale.

Pour finir, nous ne saurions trop insister, après M. Metchnikoff, sur le devoir qui incombe à chaque médecin d'examiner les matières fécales des malades atteints d'appendicite avant de les livrer à l'opérateur.

Il est bien entendu qu'au moment où l'on est appelé à chercher des œufs des différents vers dans les matières fécales, ces derniers ont déjà commis leur méfait et les microbes ont déjà eu le temps de pénétrer dans la muqueuse appendiculaire. Mais il ne faut pas oublier que l'appendicite est une maladie essentiellement à répétition. La muqueuse de l'appendice cuirassée d'un riche appareil lymphatique se débarrasse assez facilement de ces intrus microbiens, mais elle est toujours menacée par une seconde attaque, tant que son ennemi n'a pas été expulsé par un traitement approprié.

D'ailleurs, cette façon de faire est déjà adoptée en partie à Heidelberg par Czerny qui fait subir une cure anthelminthique à tous les malades atteints d'appendicite chez lesquels on soupçonne la présence d'un parasite de l'intestin (*in* Mémoire de Schiller).

Ajoutons que la recherche des œufs des vers intestinaux dans les matières fécales est d'une simplicité enfantine. Il suffit d'étaler un peu de matière sur une lame porte-objet, de verser dessus une goutte d'eau et de recouvrir le tout d'une lamelle.

1. Cantas. Appendice et Lombric, *Presse Médicale*. 1903, n° 61, p. 550.
2. Thèse de Bukarest, 1903. Analysée dans *Munch Med. Woch.* 1903, p. 1611.

Les œufs se reconnaissent très facilement à un faible grossissement.

Les œufs d'ascaride étant en général régulièrement distribués dans les matières fécales, on en trouve dans presque toutes les préparations. Quant aux œufs du trichocéphale, il faut, pour les trouver, examiner un plus grand nombre de préparations. Ayant examiné les matières dans un grand nombre de cas d'appendicite, nous croyons que douze préparations suffisent pour déceler la présence des œufs de trichocéphale. Mais il y a des cas où l'on est obligé de recommencer l'examen.

Quant aux œufs d'oxyure, on n'en a pas encore trouvé dans les matières fécales. Ce qui montre bien qu'il faut soumettre au traitement anthelminthique les malades atteints d'appendicite, même lorsque l'examen de leurs matières est négatif.

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

Fig. 1. Coupe transversale de l'appendice de chimpanzé ouvert en long.
a, *a'*) Ulcérations de la muqueuse.
b, *b'*) Nécrose limitée des différentes couches de l'appendice.
c) Foyer hémorragique péri-folliculaire.
d) Hémorragie intra-folliculaire.
Fig. 2. *a*) Extrémité de l'appendice hypertrophiée et ulcérée.
b) Cœcum.
c) Freins de la valvule iléo-cœcale.
d) Fin de l'iléon.
e) Côlon ascendant.

UNE MÉTHODE DE CULTURE

DES MICROBES ANAÉROBIES

PAR LE Dr JULES BORDET

(Travail de l'Institut Pasteur de Bruxelles.)

Un grand nombre de procédés ont été proposés pour la culture des microbes en l'absence d'oxygène, et beaucoup d'entre eux donnent des résultats satisfaisants. La plupart cependant ne permettent guère l'emploi, pour la culture des anaérobies, des objets de verrerie ordinaires usités pour celle des microbes aérobies. Il est désirable, par exemple, en vue de simplifier les manipulations, de pouvoir faire vivre les microbes qui craignent le contact de l'air, dans les ballons ou tubes à réactifs habituels, non scellés ni cachetés, bouchés simplement par un tampon d'ouate, pouvant contenir des milieux nutritifs liquides ou solides, bouillon, gélose, etc., ne différant donc en rien de ceux où l'on ensemence les bactéries aérobies.

On peut certes réaliser ce *desideratum* en mettant les tubes ensemencés dans une cloche où l'on fait le vide, si l'on a soin de remplacer ensuite les dernières traces d'air, que la trompe ne peut enlever, par un gaz inerte tel que l'hydrogène. Mais l'entretien en bon état de l'appareil producteur d'hydrogène est déjà une complication; il faut d'autre part faire le vide à plusieurs reprises, afin d'être certain que grâce aux lavages répétés par ce gaz, l'air a complètement disparu. On peut aussi, il est vrai, enlever l'oxygène non point en faisant le vide, mais en provoquant son absorption par le mélange de potasse et d'acide pyrogallique. Mais comme la capacité de la cloche doit être notable, la quantité nécessaire de ces produits est assez importante; en outre, la fixation de l'oxygène commence dès que les deux solutions sont mêlées, avant même qu'on n'ait eu le temps d'introduire le mélange dans l'enceinte close. Le pouvoir absorbant du pyrogallate n'est donc que partiellement utilisé, et l'on n'a point

toute garantie, à moins d'employer une dose exagérée de ce produit, que l'atmosphère intérieure sera complètement dépouillée d'oxygène.

Nous avons recours, depuis quelque temps, à un procédé qui n'exige aucune manipulation longue ou compliquée. Comme il est vraiment commode, il y aura peut-être quelque utilité à le décrire. Les tubes, boîtes de Petri ou ballons ensemencés, sont placés dans une cloche, dont on extrait l'oxygène, d'abord par la trompe aspirante, ensuite par le pyrogallate de potasse. Il n'y a donc rien de nouveau en ce qui concerne les moyens mis en œuvre, mais ce que le procédé offre de particulier, c'est la manière dont on les fait intervenir. En effet, l'appareil est disposé de telle sorte que la solution de potasse caustique ne vient se mélanger à l'acide pyrogallique qu'au moment où la trompe a réalisé déjà le vide le plus parfait qu'elle est susceptible de produire. La quantité d'oxygène qu'il faut faire absorber par le mélange est donc relativement minime. Il en résulte qu'on n'a pas besoin d'employer de grandes doses de réactifs. Il en résulte aussi que dans ces conditions le mélange, au lieu de se colorer en noir, ne se teint que très faiblement, en jaune ou en brun-clair, son avidité pour l'oxygène n'étant que très partiellement satisfaite. Cette couleur pâle se maintient aussi longtemps que la cloche reste fermée, et les cultures se trouvent ainsi dans d'excellentes conditions d'anaérobiose. Mais si, lorsque le développement des microbes s'est effectué, au bout de quelques jours, par exemple, on ouvre le robinet permettant l'entrée de l'air, le mélange noircit en quelques instants : son pouvoir absorbant était loin d'être épuisé, ce qui permet d'affirmer que la cloche ne contenait plus d'oxygène. On le voit, le mélange joue un double rôle : il fixe les dernières traces d'oxygène, il sert de contrôle démontrant l'absence de ce gaz dans l'intérieur de l'appareil.

L'appareil que nous avons approprié à la culture des microbes anaérobies existait déjà dans le commerce et sert ordinairement à la dessication dans le vide (*fig.* I). Il se compose de deux récipients dont l'inférieur A est cylindrique, à bords rodés (hauteur $0^{m},14$ environ; diamètre intérieur $0^{m},14$). Le récipient supérieur B est une cloche hémisphérique à robinet, munie d'un fond plat, dont la surface inférieure est soigneusement rodée,

de manière à pouvoir s'adapter parfaitement sur le bord également rodé, du récipient cylindrique A. Ce fond plat de la cloche B se relève vers le centre en un rebord haut de $0^{m},05$ environ, lequel circonscrit une ouverture circulaire B établissant une large communication entre les deux parties de l'appareil [1].

C'est dans le récipient inférieur A que l'on dispose la verrerie servant aux cultures. Il est nécessaire que ces tubes, boîtes, etc..., ne puissent ballotter trop librement lorsqu'on remue l'appareil. On les maintient donc au moyen d'un support ou panier en zinc (à compartiments s'il est destiné à recevoir des tubes) auquel on donne une forme bien appropriée.

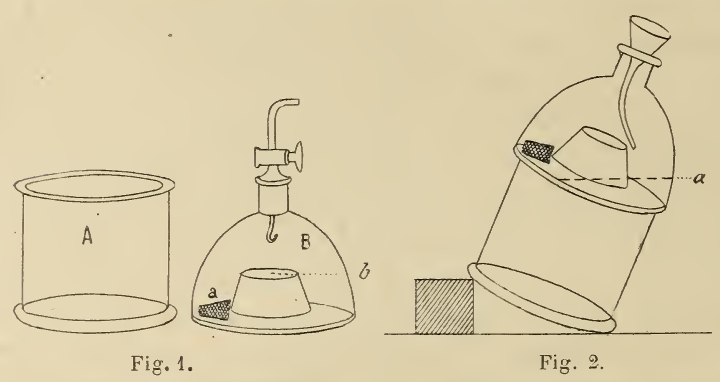


Fig. 1.
a. — Paquet d'acide pyrogallique.

Fig. 2.
a. — Niveau de la solution de potasse.

Les cultures étant en place, on met sur le fond de la cloche B, en l'introduisant par l'ouverture circulaire *B*, un petit paquet de papier-filtre pas trop épais, contenant environ 5 grammes d'acide pyrogallique. On applique alors (*fig.* II) la cloche B sur le récipient A. On incline ensuite assez fortement l'appareil, en le calant au moyen d'un cube de bois, de telle manière que le point le plus élevé du fond de la cloche B soit précisément celui où repose le paquet d'acide pyrogallique. Le robinet étant enlevé, on introduit par le goulot un entonnoir dont la tige présente une courbure assez accentuée. On tourne l'entonnoir de façon à diriger son orifice inférieur vers la partie la plus déclive de la cloche B, donc vers le point opposé à celui où se trouve le paquet. On verse 100 à 120 centimètres cubes d'une solution

1. Quand on se sert de l'appareil pour dessécher dans le vide, on met de l'acide sulfurique ou de la potasse sur le fond de la cloche B.

à 10 0/0 environ de potasse caustique; grâce à l'inclinaison, le niveau de la solution ne s'élève pas assez pour toucher l'acide pyrogallique. On replace le robinet qu'on raccorde à la trompe, et l'on fait le vide. Lorsque la raréfaction a atteint le maximum [1], on ferme le robinet, et l'on enlève le cube de bois; l'appareil reprenant sa position horizontale, la solution de potasse vient inonder l'acide et le mélange absorbant est constitué.

Pour assurer l'étanchéité absolue de l'appareil, même à la température de l'étuve, il convient d'employer, pour enduire les surfaces rodées en contact (ainsi que le goulot dans lequel entre le robinet de verre), le lut bien connu qui permet le maintien indéfini du vide, et qu'on obtient en mélangeant par fusion parties égales de cire et de vaseline. Lorsqu'on veut, le séjour à l'étuve ayant été suffisant, ouvrir l'appareil après avoir laissé rentrer l'air, il faut un certain effort pour vaincre l'adhérence; aussi, pour qu'une secousse n'ait point de conséquence fâcheuse, est-il nécessaire que les ustensiles de culture contenus dans le vase inférieur soient bien maintenus dans leur support; il faut surtout qu'aucun col de ballon ou extrémité supérieure de tube ne vienne s'engager dans l'ouverture de communication que circonscrit le rebord partant du fond de la cloche B. Il est préférable en outre de séparer les deux parties de l'appareil au moment où celui-ci sort de l'étuve, le lut étant alors plus mou.

L'appareil que nous venons de décrire tel que nous l'avons trouvé dans le commerce, et qui sert habituellement de dessiccateur, pourrait avec avantage être légèrement modifié quant à ses dimensions, en vue de cette destination nouvelle à la culture des anaérobies. La cloche B qui sert de couvercle pourrait, tout en gardant son diamètre actuel, être un peu moins haute, de forme un peu plus aplatie ou surbaissée, ce qui diminuerait la capacité. D'autre part, il serait bon que le récipient inférieur A fût plus étroit et plus haut, mesurât par exemple $0^m,12$ de diamètre intérieur, $0^m,18$ à $0^m,19$ de hauteur [2].

En vue de diminuer autant que possible la quantité d'air contenu dans l'appareil et par conséquent de réduire encore la

1. Il convient que l'aiguille de l'indicateur du vide atteigne les graduations 70 à 72.

2. Nous sommes obligés avec l'appareil actuel dont la hauteur est de $0^m,14$ seulement d'employer pour les cultures des tubes à réactifs un peu courts ($0^m,14$ environ). Il est vrai que cela ne présente pas d'inconvénients bien sérieux.

dose d'oxygène que le mélange doit absorber, on peut introduire dans le récipient A, une couche d'eau de quelques centimètres de hauteur. Si l'on a soin d'employer de l'eau chauffée vers 40°, on pourra, en faisant fonctionner la trompe, en provoquer l'ébullition, ce qui facilitera encore l'extraction de l'air. Dans ces conditions, la quantité d'oxygène qui reste dans la cloche peut être si faible, que le mélange absorbant réalisé par la rencontre des réactifs ne se teint qu'en jaune à peine visible.

Nous avons employé l'appareil à la culture de divers anaérobies, surtout à celle du bacille tétanique, qui, ensemencé en tube de gélose, pousse très bien sur la surface de ce milieu, sous forme de colonies blanches opaques.

ERRATA

N° 4 — avril 1904. — Mémoire de M. C. Nicolle, page 210, ligne 33, au lieu de bicarbonate de potasse, lire *bichromate ae potasse.*

Pages 221 et 224, aux renvois (1) lire *Halipré* au lieu de Halipié.

Le Gérant : G. Masson

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE JUIN 1904 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

NOTICE

Sur la vie et les travaux d'Émile Duclaux

Émile Duclaux est né à Aurillac, département du Cantal, le 24 juin 1840, de Justin Duclaux, huissier près le tribunal de cette ville, et d'Agnès Farges qui tenait un petit commerce d'épicerie au coin de la rue Neuve et de la rue Marinie, aujourd'hui rue Victor-Hugo.

Justin Duclaux[1], suivant une coutume fort ancienne en Auvergne, avait voyagé en Espagne; c'était un homme instruit, d'esprit ouvert et de jugement sain. Il n'avait point le cœur insensible que l'on attribue volontiers aux huissiers, il accordait aux débiteurs tous les délais possibles. Avec lui, les protêts n'étaient enregistrés qu'à la dernière minute; alors, son fils Émile courait au bureau de l'enregistrement; d'où la légende que É. Duclaux avait été saute-ruisseau et clerc d'huissier. Sa mère, femme d'une parfaite bonté, se distinguait par sa simplicité, son bon sens, son amour de l'ordre et un grand désir d'obliger. Elle eut deux autres fils : Louis et Eugène; ce dernier mourut en 1866.

1. Justin Duclaux descendait d'une famille de la haute Auvergne, les Pichot-Duclos, alliés au conventionnel Hébrard.

Le père d'Agnès Farges, Pierre Farges, appartenait à une famille de petits propriétaires terriens fixés dans la paroisse de Crandelles, puis dans celle d'Ytrac. On peut suivre leur trace jusqu'en 1624. A la veille de la Révolution, l'arrière-grand-père, Louis Farges, était receveur des dîmes de l'abbaye d'Aurillac. Tous les Farges, durant cinq générations, avaient commercé en Espagne.

Ces détails sur la famille de É. Duclaux ont été communiqués par M. Louis Farges, son cousin.

Le père d'Émile Duclaux fut son premier maître, il lui montra à lire et veilla ensuite à son éducation avec un dévouement persévérant. Le jeune Émile était son compagnon et c'est au cours de leurs promenades à travers ce beau pays d'Auvergne qu'il prit le goût des choses de la nature et l'amour du sol natal.

La première école fréquentée par É. Duclaux fut celle de Mlle Lieurade, qui tenait une classe enfantine. Puis, il fit d'excellentes études classiques au collège communal, en compagnie de camarades aussi travailleurs que lui, parmi lesquels ses amis le docteur Jules Rengade et J.-B. Rames, plus tard pharmacien à Aurillac et passionné géologue de la région du Cantal. Un professeur de mathématiques, M. Appert, exerça sur le futur savant une véritable influence; Duclaux lui a témoigné sa reconnaissance dans une notice que les anciens élèves d'Appert n'ont pu lire sans émotion.

Jusqu'à l'âge de dix-sept ans, Duclaux a donc vécu dans un milieu familial modeste, laborieux, mais avisé et instruit, avec des camarades un peu rudes sans doute, mais intelligents et travailleurs, dans une province montagneuse, au climat rigoureux, aux paysages admirables. Ces circonstances expliquent les habitudes de travail de toute sa vie, la franchise de son caractère, sa simplicité, sa ténacité et aussi le tour poétique de son esprit que révélait sa parole imagée et évocatrice.

Après avoir appris au collège d'Aurillac tout ce qu'on y enseignait, É. Duclaux vint à Paris en 1857 et suivit la classe de mathématiques spéciales du lycée Saint-Louis comme élève de l'institution Barbet-Massin. Reçu en même temps (1859) à l'École polytechnique et à l'École normale supérieure, il choisit l'École normale et en sortit agrégé des sciences physiques en 1862. Pasteur l'admit alors dans son laboratoire en qualité d'agrégé-préparateur; Duclaux y trouva la direction scientifique de toute sa vie.

En 1865, après avoir soutenu sa thèse pour le doctorat-ès-sciences physiques, il est nommé professeur au lycée de Tours. Il se lia d'amitié avec un de ses collègues déjà âgé, M. de Tastes, physicien distingué et observateur sagace qui l'initia à la météorologie.

Une année plus tard, Duclaux était appelé à la Faculté des Sciences de Clermont-Ferrand comme suppléant de la chaire de

chimie. Son père était mort en 1860 ; sa mère vint s'installer avec lui rue Montlosier. Malgré quelques difficultés avec le titulaire de la chaire, M. Aubergier, Duclaux trouva dans la capitale de la Basse-Auvergne un lieu propice au travail. Le laboratoire de la faculté manquait d'outillage, mais le nouveau professeur savait faire beaucoup avec de petits moyens. D'ailleurs, il avait rencontré plusieurs anciens élèves de l'Ecole normale, professeurs au lycée, et ils formaient entre eux une société de jeunes savants passionnés pour la science et les idées généreuses. Le cours fini, Duclaux se rendait près d'Alais, à Pont-Gisquet, pour aider M. Pasteur dans ses études sur la maladie des vers à soie.

La guerre de 1870, puis la Commune empêchaient Pasteur de rentrer à Paris; il vint à Clermont près de son élève, très fier de lui ouvrir sa maison et son laboratoire. Pour se consoler des malheurs de la patrie, Pasteur projetait toute une série de recherches sur les industries de la fermentation. Tout d'abord il voulait étudier scientifiquement la fabrication de la bière où les Allemands étaient passés maîtres. Les expériences commencées au laboratoire étaient répétées sur une plus grande échelle à la brasserie Kuhn, située à Chamalières, entre Clermont et Royat ; elles ont abouti aux célèbres *Etudes sur la bière* qui ont renouvelé l'industrie du brasseur.

Duclaux pensait, lui aussi, qu'un des plus puissants moyens de relèvement de la France était le développement de l'enseignement supérieur. Une centaine de jeunes gens, presque tous étudiants en médecine, étaient réunis à Clermont et surtout occupés de leurs études professionnelles. Duclaux essaya d'élargir leur horizon et de donner au moins à quelques-uns d'entre eux le goût de la recherche scientifique. Pour cela, il faisait des conférences où il exposait la doctrine de Pasteur et annonçait la révolution qu'elle allait apporter en chirurgie et en médecine. Il ouvrit aussi un cours supplémentaire de chimie biologique. Duclaux avait le don de l'enseignement : à l'heure de sa leçon, les étudiants désertaient l'École de médecine pour l'amphithéâtre de la Faculté des Sciences. Aucun professeur n'avait autant d'action sur les élèves ; il exposait si clairement le sujet que tout le monde comprenait, et sa parole était celle du savant brûlant du « feu sacré ». Il donnait à réfléchir, de sorte que, le

cours fini, on vivait encore avec lui. A l'écouter, beaucoup sentaient naître en eux la passion de la chimie et le désir d'expérimenter. Ces vocations n'ont point toutes persisté et les auditeurs de Duclaux ne sont pas tous devenus chimistes, mais tous ont gardé pour leur professeur une affection et une admiration durables.

Cet enseignement lui permit de choisir, parmi les plus zélés, quelques étudiants qu'il admit à son laboratoire et qu'il prenait plaisir à initier à la méthode expérimentale. Duclaux était un maître attentif : tout en fredonnant, il surveillait une distillation fractionnée et suivait les manipulations de ses disciples; il faisait impitoyablement recommencer celles mal réussies et les analyses entachées d'erreur. Il ne prodiguait pas les éloges; quand il était satisfait, une fois la journée finie, il vous invitait à l'accompagner en causant jusqu'à sa porte. La grande récompense consistait en excursions, faites avec lui le dimanche, dans la vallée de Fontana, vers le puy de Dôme. Du sommet de cet admirable observatoire, il se plaisait à expliquer les mouvements de la chaîne des puys et des coulées volcaniques. Pendant ces heures de vie au grand air, Duclaux était le plus charmant des compagnons, d'une gaieté spontanée et profonde. La journée se terminait en famille à la table de « maman Duclaux », dans l'appartement de la rue Montlosier. C'était vraiment un bonheur pour un débutant dans la carrière scientifique de rencontrer un maître comme Duclaux.

En 1873, Duclaux quitta Clermont-Ferrand pour Lyon où il était appelé à la chaire de physique de la Faculté des Sciences. Il s'y révéla aussi bon professeur de physique qu'il s'était montré bon professeur de chimie, bientôt il occupa une place à part, à cause de son autorité sur les étudiants et de son influence, dans les conseils de la Faculté. C'est à cette époque qu'il épousa Mlle Mathilde Briot, la fille de l'éminent mathématicien. Duclaux trouva le bonheur dans cette union. Sa femme avait de la grâce, l'âme délicate, l'esprit fin et le jugement solide. Elle lui donna deux fils, et les vœux de Duclaux étaient comblés, lorsqu'en 1878 il fut nommé, au concours, professeur de météorologie à l'Institut agronomique et chargé en même temps d'une conférence de chimie biologique à la Sorbonne.

Jusqu'alors, Duclaux avait été tenu éloigné de sa science de

prédilection, de cette microbiologie qu'il avait vue naître chez Pasteur. Il allait donc enfin pouvoir l'enseigner et la répandre. Le nouveau maître de conférences n'avait à sa disposition aucun laboratoire, et si Pasteur ne lui avait pas donné asile dans le sien à l'École normale, Duclaux aurait été obligé de parler de microbes à ses auditeurs sans leur en montrer aucun. Avant chaque leçon, on transportait, dans un panier, cultures et microscopes, de la rue d'Ulm jusqu'à la Sorbonne.

Malgré tout, Duclaux se tenait pour satisfait, lorsqu'il fut atteint par le plus affreux des malheurs : sa femme mourait quelques semaines après avoir mis au monde un troisième enfant. Pendant vingt années, cette perte assombrit la vie de Duclaux, il pensait toujours à la disparue. Il cherchait un allègement à sa peine près de son beau-père et de Mme Briot qui prenait soin des petits enfants. C'était un spectacle touchant que celui de ces deux hommes de haute culture et de grande force morale réunissant leur douleur pour la sentir moins lourde. Briot mourait lui-même en 1882.

Duclaux déploie alors une activité incroyable : dans la journée, il se prodigue à l'Institut agronomique et à la Sorbonne ; le matin et le soir, il est à sa table de travail. Pas un instant il ne reste oisif. Il publie son livre, *Ferments et Maladies*, dédié à la mémoire de sa femme et né d'une pensée touchante. Mme Duclaux avait succombé à une infection puerpérale ; Duclaux, convaincu que les progrès dus à la théorie pastorienne feront bientôt disparaître ces infections, veut hâter ce moment en faisant connaître aux médecins la doctrine nouvelle. Son ouvrage qui a pour titre *Microbiologie* paraît en 1883 et celui intitulé *Fermentation* en 1884.

Ce labeur intense distrayait Duclaux de son chagrin. Il écrivait avec une facilité extraordinaire parce qu'il ne prenait la plume qu'après avoir beaucoup réfléchi. Il couvrait les pages d'une écriture fine, régulière, plaisante à l'œil, paraissant facile à lire, mais qui réservait plus d'une difficulté à qui n'avait pas l'habitude de la déchiffrer. Duclaux suit, au jour le jour, les travaux du laboratoire de Pasteur sur le choléra des poules, le charbon, la rage, l'atténuation des virus. Pendant les vacances, il s'installe au Fau, dans le Cantal, où il a établi, en plein pâturage, une station laitière. Il étudie sur place la com-

position du lait, la fabrication de la fourme d'Auvergne et les perfectionnements à y apporter.

Après la grande découverte du traitement préventif de la rage, en 1885, l'Institut Pasteur est fondé. Duclaux, nommé professeur titulaire à la Sorbonne, transporte son enseignement dans le nouvel Institut (1888), et lui donne un organe pour la publication de ses travaux en faisant paraître les *Annales de l'Institut Pasteur* (1887). Les articles originaux et les revues critiques qu'il y écrit en assurent promptement le succès. Jusqu'à la veille de sa mort, il n'a cessé de s'en occuper, choisissant et revoyant les mémoires, corrigeant lui-même les épreuves.

Depuis 1888, la vie de Duclaux est confondue avec celle de l'Institut Pasteur; il s'efforce d'y attirer les travailleurs et de le doter de ce qui lui manque.

A la mort de Pasteur, en 1895, il prend la direction et fait de ce grand établissement une sorte de « coopérative scientifique » où, tout en conservant l'indépendance de ses idées, chacun travaille en vue d'un but commun. Duclaux est le vrai chef qui convient à cette maison, son autorité est aimée et respectée parce qu'elle est celle du plus digne.

Pendant huit années qu'il reste à sa tête, l'Institut Pasteur ne cesse de grandir. Grâce à une généreuse anonyme, les terrains qui s'étendent de la rue Dutot à la rue de Vaugirard sont achetés, l'hôpital Pasteur est construit. A côté de lui, s'élève l'Institut de Chimie biologique fondé par la libéralité de la baronne de Hirsch. Duclaux ne craignit pas de faire grand tant il avait confiance dans l'avenir de l'Institut Pasteur qui, disait-il, sortirait plus robuste de cette crise de croissance.

Dès 1888, Duclaux était entré à l'Académie des Sciences, dans la section d'Économie rurale, en 1894 à l'Académie de Médecine en qualité de membre libre, et en 1890 à la Société nationale d'Agriculture.

Duclaux ne s'était jamais occupé de politique, il avait toujours vécu loin des affaires publiques, retiré dans la « tour d'ivoire » des spéculations scientifiques, lorsque survint l' « affaire » qui a tant agité la France. Il se jeta dans la mêlée, publia brochures et articles de journaux, parut dans les réunions publiques. Beaucoup le lui ont reproché sans comprendre les motifs qui avaient ému cette âme ardente et délicate. Il s'exposait à

l'orage par devoir, par amour pour son pays. Il croyait que tout citoyen qui a la nette conscience que le droit et la justice ont été méconnus doit le proclamer. Dans cette période tourmentée, Duclaux a fait preuve du plus rare courage, du plus généreux talent, il a dépensé au delà de ses forces. Pour lui, tout le mal venait de la mauvaise tournure donnée à l'esprit par l'éducation actuelle, il voulait que l'on reprît tout par la base et qu'on apprît aux gens à penser. Aussi a-t-il contribué de tout son cœur aux entreprises d'éducation populaire nées dans ces dernières années.

Un grand bonheur survint qui rasséréna sa vie. En 1901, Duclaux épousait une femme d'aussi grand cœur que de grand talent, Mme James Darmesteter (Mary Robinson).

Revenu tout entier à ses occupations scientifiques, il s'y livrait avec une allégresse qui témoignait de sa joie intime, lorsqu'en janvier 1902 il fut terrassé par une première attaque. Soigné avec la plus tendre sollicitude, il était debout après quelques mois, ne conservant qu'un peu d'embarras de la parole et de paresse de la main.

Duclaux connaissait la gravité de l'accident qu'il avait subi, mais il avait trop l'habitude du travail, pour rester longtemps inactif. Il se remit à écrire pour les *Annales* et, après un repos au pays natal, il reprit son cours au printemps de 1903. C'était une imprudence, il dut l'interrompre ses leçons. Duclaux était résolu à renoncer à l'enseignement ; déjà, il prenait ses dispositions pour se faire remplacer à la Sorbonne quand, dans la soirée du 2 mai 1904, il perdait subitement connaissance. Il mourait dans la nuit.

Duclaux ne parlait jamais de lui. Aussi les lignes qui précédent ne peuvent-elles donner qu'une idée incomplète de sa vie intime. Les amis qui ont été le plus mêlés à son existence n'ont jamais surpris en lui la moindre défaillance morale ; il reste pour eux le modèle auquel ils voudraient ressembler.

*
* *

La carrière scientifique d'É. Duclaux date de son entrée au laboratoire de Pasteur en 1862. A cette époque, on était en pleine querelle des générations spontanées. Pasteur soutenait que les

fermentations sont causées par des êtres microscopiques provenant de parents semblables à eux; Joly, Pouchet et Musset prétendaient au contraire que les êtres microscopiques naissent spontanément dans les liquides organiques. C'était le temps où venaient fréquemment, au laboratoire de la rue d'Ulm, Dumas et Balard, membres de la Commission nommée par l'Académie des Sciences pour se prononcer entre Pasteur et les hétérogénistes. Duclaux assistait à cette bataille de doctrines et participait aux expériences de Pasteur. Quelles fructueuses leçons de science expérimentale pour un débutant !

Les premiers travaux de Duclaux portent la marque des préoccupations d'alors ; il publie en 1862 une note *sur la germination des corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère*, puis en 1865, sa thèse pour le doctorat ès sciences, relative à l'*absorption de l'ammoniaque et à la production d'acides gras volatils dans la fermentation alcoolique*. Il y montre que la levure ne dégage pas de l'ammoniaque, comme une substance en putréfaction, mais qu'elle assimile au contraire l'azote du tartrate d'ammoniaque ajouté à la liqueur, pour en construire ses tissus. En même temps, la levure élimine des acides volatils, notamment de l'acide acétique.

Ces acides volatils que Duclaux rencontre au début de ses études sur les fermentations n'ont cessé de l'occuper dans la suite. Ils sont en très petite quantité, mais ils caractérisent les fermentations et entrent dans la composition des éthers odorants qui forment le bouquet. Duclaux indique un procédé simple et exact pour en faire l'évaluation qualitative et quantitative. Il consiste à séparer par distillations fractionnées des portions d'égal volume et à doser l'acide contenu dans chacune d'elles au moyen d'une liqueur alcaline. On inscrit à la suite les nombres lus sur la burette, ils vont en croissant ou en décroissant suivant une loi régulière caractéristique de l'acide. Comme il existe un rapport constant entre la quantité d'acide présente dans la liqueur primitive et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, on peut conclure la quantité d'acide total de celle passée dans les premières parties rassemblées à la distillation fractionnée. Lorsqu'il y a un ou plusieurs acides mélangés, chacun se comporte comme s'il était seul et la marche des nombres recueillis révèle la composition du mélange. Duclaux est

revenu à diverses reprises sur cette question, il a dressé des courbes et des tables qui facilitent le dosage des acides volatils dans les mélanges; elles sont utilisées chaque jour dans les laboratoires.

Cette méthode des distillations fractionnées est d'une grande sensibilité pour juger de la pureté des corps volatils. Il suffit d'en faire une solution à 1 ou 2 0/0, de la partager en deux parties égales et d'étudier chacune d'elles au moyen des distillations fractionnées. Si les nombres obtenus dans les deux cas sont les mêmes, le corps est certainement pur. Ce procédé montre à Duclaux que les acides formique et acétique du commerce sont très purs, que l'acide butyrique ne l'est jamais malgré que la densité et le point d'ébullition puissent le faire considérer comme pur. L'acide valérianique est presque toujours mélangé d'acide acétique. Duclaux indique le moyen de le préparer de façon qu'il subisse victorieusement l'épreuve de la distillation fractionnée telle qu'il l'a indiquée.

Duclaux a fait du compte-gouttes un instrument de dosage d'une commodité et d'une sensibilité admirables. En effet, il permet d'évaluer avec une précision extraordinaire la tension superficielle ou constante capillaire de divers liquides, il convient donc pour apprécier les plus faibles quantités d'alcools supérieurs mélangés dans le vin à l'alcool ordinaire. Le nombre de gouttes fourni par 5 c. c. de liquide est d'autant plus grand qu'il y a plus d'alcools étrangers. Dans les mélanges d'alcool et d'eau, les différences sont au maximum pour une richesse alcoolique voisine de 25°.

Les acides volatils qui font aussi varier la tension superficielle des liquides peuvent être appréciés par l'usage du compte-gouttes. Par ce procédé de dosage sûr et délicat, Duclaux étudie la production des acides volatils dans le vin. Le vin naturel renferme de l'acide acétique et un peu d'acide butyrique; la proportion normale de ce dernier est de 1/12 à 1/15 du premier.

Il existe encore un peu d'acide valérianique, environ 10 milligrammes par litre. Les diverses maladies du vin sont caractérisées par un changement dans la composition du mélange d'acides volatils. Le vin poussé renferme de l'acide acétique et de l'acide propionique en parties à peu près égales, le

vin tourné de l'acide acétique et de l'acide butyrique en plus forte proportion que le vin normal.

Le compte-gouttes sert encore à Duclaux pour étudier la stabilité des émulsions, qui dépend surtout de l'égalité de tension superficielle des deux liquides émulsionnés.

Dans une série de mémoires parus dans les *Annales de physique et de chimie*, Duclaux applique aux phénomènes d'osmose, les lois des mouvements des liquides dans les espaces capillaires ; il conclut « que, si une substance poreuse quelconque, mouillée sur ses deux faces par des liquides différents, s'imbibe d'un liquide de préférence à l'autre, les phénomènes d'endosmose ou d'exosmose ne sont que des cas particuliers des phénomènes de diffusion. »

Duclaux rattache aux phénomènes d'adhésion moléculaire les modifications éprouvées par les solutions salines au contact de la terre, les phénomènes de teinture, les questions de la dissolution des gaz dans les liquides et celles de dissolution des liquides dans les liquides. Il est amené à s'occuper de la séparation des liquides mélangés et à construire des thermoscopes à maxima et minima qui ne craignent pas les chocs, ne subissent pas l'influence de la pression, sont pour ainsi dire indérangeables et constituent des instruments élégants aussi simples que précis.

L'étude des tensions superficielles a été un des sujets de prédilection de Duclaux, il a réuni ses idées sur le sujet en un corps de doctrine, dans un ouvrage intitulé *Traité élémentaire de la capillarité*, où il explique les faits connus en s'appuyant uniquement sur l'expérience « sans soulever aucune controverse théorique ».

Dans un travail *sur les forces élastiques des vapeurs émises par un mélange de deux liquides*, il envisage le cas du mélange des divers alcools avec l'eau, et il montre que la composition volumétrique du mélange de vapeurs qui s'échappe d'un liquide de composition donnée est indépendante de la nature des corps qui entrent dans le mélange et que la température d'ébullition du mélange est celle où la tension est maxima. Ces conclusions sont les mêmes pour les acides formique et acétique, elles expliquent les particularités observées dans la distillation de ces acides et attribuées à la formation de prétendus hydrates.

Duclaux a été conduit à la physique par la chimie. Son œuvre de physicien est tout à fait personnelle, elle se développe hors des sentiers battus et montre le souci de l'auteur de substituer des raisons simples aux explications compliquées.

***

Lorsque Pasteur s'engagea dans l'étude des maladies des vers à soie, Duclaux fut son collaborateur en même temps que Gernez et Maillot. Il conduisait des éducations et examinait les graines au microscope dans le petit laboratoire de Pont-Gisquet. Mais, tout en prenant part aux recherches qui ont conduit au grainage cellulaire, Duclaux faisait des observations originales sur la respiration de la graine et sur l'influence du froid sur sa germination. Le refroidissement de l'hiver est nécessaire pour la bonne éclosion de la graine, un abaissement artificiel de la température produit le même effet. On peut provoquer l'éclosion de la graine au moment choisi si on l'a mise à la glacière quelques jours auparavant. L'industrie séricicole a tiré de ces observations de Duclaux le plus utile parti pour une bonne hibernation de la graine et pour sa conservation. De même, certaines graines végétales ne germent bien qu'après avoir été refroidies.

Un autre fait très curieux signalé aussi par Duclaux, c'est qu'un court passage d'une graine de ver à soie dans l'acide sulfurique concentré provoque son éclosion. Il est bon de rappeler cette expérience au moment où les biologistes s'occupent avec tant d'ardeur des phénomènes d'évolution d'œufs non fécondés, sous l'influence d'actions physiques ou chimiques.

***

Dès qu'il le peut, Duclaux revient à l'étude des microbes par laquelle il a débuté chez Pasteur. Les microbes sont présents dans le tube intestinal de l'homme et des animaux; il y en a dans l'estomac, daus l'intestin grêle, et ils sont innombrables dans le gros intestin. Ces organismes microscopiques, agents très actifs de transformation des matières organiques, sécrètent des diastases changeant l'amidon en sucre, peptonisant l'albumine. Il faut donc tenir compte de leur présence dans la digestion des aliments. Jusqu'à Duclaux, on ne l'avait pas fait;

dans toutes les expériences de digestion naturelle et artificielle, ils ont une part qui n'avait pas été déterminée. Est-elle secondaire, est-elle essentielle? On n'en savait rien.

Duclaux a résolu la question en faisant des digestions artificielles avec les divers sucs digestifs privés de microbes. On arrive facilement à stériliser le suc gastrique par filtration à travers une paroi de porcelaine dégourdie, mais le suc pancréatiques visqueux ne peut être purifié par ce moyen. Duclaux tourne la difficulté, en prélevant avec pureté, chez un animal en pleine digestion, de petits fragments de pancréas qui sont mis, dans des tubes flambés, au contact des substances à digérer.

Les résultats obtenus sont d'une grande netteté. Les microbes ne jouent aucun rôle dans la digestion gastrique et pancréatique. Paralysés par l'acide de l'estomac, ils ne pullulent que dans l'intestin, et après la digestion physiologique opérée par les sucs glandulaires, commence une digestion microbienne qui s'attaque aux celluloses et dégage des gaz intestinaux.

Ces travaux ont été confirmés depuis fort élégamment, par les expériences qui consistent à élever des poulets sortant de l'œuf, dans un milieu privé de microbes, avec une nourriture stérilisée.

Les mêmes idées ont inspiré les recherches de Duclaux *sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes.* Les matières organiques hydrocarbonées et azotées, introduites dans le sol, sont transformées par les microbes en substances plus simples (eau, acide carbonique, ammoniaque, acide nitrique) utilisées par les végétaux. Cette transformation est-elle indispensable ? Des plantes auxquelles on offrirait du sucre ou des matières albuminoïdes ne seraient-elles pas capables de les assimiler directement? Il est d'autant plus naturel de se poser cette question que, dans une graine en germination, par exemple, il existe des diastases convertissant l'amidon en sucre. Duclaux juge la question en faisant germer des pois et des haricots sur un sol sans microbes, humecté de lait, d'empois d'amidon, de solution de sucre, par comparaison avec des pois et des haricots placés dans le même sol arrosé d'eau pure. La germination des graines et la croissance des plantules sont identiques dans les deux cas. Le végétal n'utilise pas la nourriture mise à sa disposition, l'amidon n'est pas sac-

charifié, le sucre n'est pas interverti, la caséine n'est pas consommée. On les retrouve tels qu'on les a mis. Les diastases contenues dans les cellules de la plante n'en sortent pas et ne peuvent agir au dehors. Les microbes sont donc indispensables pour préparer la nourriture des végétaux, sans eux la terre serait infertile.

Ces questions si importantes du rôle des microbes dans la digestion ont été étudiées par Duclaux, pour ainsi dire sans effort, tant les méthodes qu'il a employées sont simples et faciles. On leur doit tous les progrès accomplis sur ce sujet.

Une remarque faite au cours des recherches précédentes a conduit Duclaux à étudier l'*action de la lumière solaire sur les substances hydrocarbonées*. Dans des tubes exposés à la lumière et contenant des solutions de sucre, celui-ci est modifié en l'absence de tout organisme microscopique. Sous l'action de l'air et des radiations solaires, il est transformé en groupements plus stables. L'air peut ne pas intervenir dans la réaction et il se fait alors une sorte de combustion intérieure. En milieu alcalin, le sucre fournit de l'alcool et de l'acide carbonique comme sous l'action du ferment alcoolique. Duclaux désirait beaucoup reprendre l'étude de ces réactions dues à la lumière du soleil, il pensait que des traces de corps minéraux empruntés au verre des tubes exerçaient une influence sur leur marche.

*
* *

Aucun liquide organique n'est plus exposé que le lait à l'invasion des microbes, toutes les altérations qu'il subit sont causées par eux. Le cultivateur qui trait ses vaches et prépare le beurre et le fromage, le commerçant qui transporte et vend le lait, le nombre immense de ceux qui le consomment ont affaire à ces microbes. Et cependant, on avait fort négligé ces ferments qui sont partout, qui commandent tout. Duclaux les met à leur véritable place, c'est-à-dire à la première, car il est convaincu que le progrès de l'industrie laitière dépend de nos connaissances à leur sujet. Il leur a consacré une bonne part de son temps; ce qu'il apprenait sur eux a été publié au fur et à mesure, puis résumé en deux livres : *Le Lait* et *Les Principes de laiterie*.

Tout d'abord, Duclaux s'attache à la constitution et à la

composition du lait. A la station laitière du Fau, à l'Institut agronomique, il exécute un grand nombre d'analyses et perfectionne les méthodes de dosage. Ses études sur la tension superficielle trouvent leur application à propos de l'état des globules de beurre dans le lait. Ils ne sont point, comme on l'a cru, entourés d'une membrane, ils sont à l'état d'émulsion et la stabilité de celle-ci est due à ce que la tension superficielle du sérum diffère très peu de celle du corps gras. La façon dont le barattage amène la soudure des globules de beurre est expliquée. Puis Duclaux s'occupe de la composition du beurre, de sa teneur en acides volatils et du rancissement.

On admettait que le lait renferme, en dehors de la caséine, des matières albuminoïdes telles que l'albumine, la lactoprotéine, l'albuminose, etc... Pour Duclaux, tous ces noms ne correspondent nullement à des espèces chimiques, ils s'appliquent aux agrégations moléculaires d'une même substance, déterminées par l'action des réactifs employés. En réalité, il n'y a dans le lait que de la caséine sous deux états, celui de dissolution parfaite passant à travers les cloisons poreuses et celui de suspension. C'est pour cela qu'avec le temps, la caséine se dépose en partie. Il en est de même du phosphate de chaux qui est dissous pour une part et suspendu pour l'autre; lui aussi se rassemble peu à peu au fond des vases, est entraîné par les précipités, ce qui a fait croire qu'il intervenait dans la coagulation du lait par la présure.

Ces données établies, Duclaux s'occupe de l'action de la présure sur le lait; pour éliminer toute action microbienne, il filtre la présure sur porcelaine et il examine en détail l'influence de la température, des divers sels, de petites quantités d'acide et de base. Il nous donne un véritable guide pour l'étude des diastases.

La présure n'est pas la seule diastase de la caséine, il en existe une autre, la caséase, qui redissout le coagulum formé par la première. Toutes deux sont utiles pour la digestion du lait; la présure se trouve dans le suc gastrique des animaux à la mamelle, la caséase dans le suc pancréatique.

Présure et caséase sont aussi préparées par les microbes; par leur intermédiaire, ils agissent sur la caséine et jouent un rôle prépondérant dans l'industrie fromagère. Dès la mise en présure, pendant que la caséine s'égoutte dans la forme, les

microbes se mettent à l'œuvre. Les premiers qui se développent dans un fromage de Brie, par exemple, sont les ferments du lactose qui transforment le peu de sucre restant en acide lactique, puis des moisissures particulières consomment l'acide lactique. En faisant disparaître l'acidité, elles permettent aux ferments de la caséine de s'installer sur la pâte. Ce sont eux qui mûrissent le fromage, donnent à la pâte l'aspect transparent, grâce à leur caséase qui pénètre peu à peu la masse. En même temps, les produits sapides, élaborés aussi par les microbes, constituent le bouquet particulier du fromage. Duclaux isole un à un tous ces organismes pour déterminer leur action sur le sucre, la caséine et le beurre. Le fromage est donc le résultat de cette collaboration microbienne. Chacun des ouvriers microscopiques doit travailler à son tour et s'arrêter au bon moment. Un semblable atelier est difficile à conduire et il a fallu la pratique des siècles pour obtenir des produits dont le goût et l'aspect soient toujours les mêmes. Les travaux de Duclaux inaugurent l'ère scientifique de la laiterie. Dans l'avenir, les incertitudes de la fabrication disparaîtront, et les pertes actuellement si considérables, causées par les fermentations anormales, véritables maladies du fromage, pourront être prévenues.

L'analyse chimique met en évidence les modifications de la pâte correspondant aux diverses étapes de la maturation.

Duclaux étudie tour à tour les divers types de fromages, ceux à pâte molle et ceux à pâte dure, notamment le fromage du Cantal qui est une des richesses de son pays natal.

Ces diastases que Duclaux vient de voir à l'œuvre dans la fabrication des fromages, jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes de la vie. Aussi deviennent-elles pour lui un sujet favori d'études. Il y revient à maintes reprises, il montre comment un même organisme microscopique sécrète des diastases différentes suivant la nourriture qui lui est offerte. Il classe les diastases suivant les réactions qu'elles déterminent et propose la terminologie adoptée aujourd'hui. Il essaye de déterminer les lois d'action de la présure et de la caséase, il les figure dans des courbes et les met en formules. Il est un des initiateurs du mouvement actuel qui a déjà fourni de si intéressants résultats.

***

Les mémoires originaux analysés dans les lignes précédentes

ne constituent pas toute l'œuvre de Duclaux. Il a écrit : *Ferments et Maladies* refondu et édité ensuite sous le titre de *Microbes et Maladies*. Ces deux livres résument les travaux de l'Ecole de Pasteur, ils sont pour ainsi dire l' « Evangile » de la nouvelle doctrine. Leur influence a été considérable, ils ont amené à croire aux microbes nombre de médecins qui les niaient jusqu'alors.

A son livre de *Microbiologie* publié en 1883, succède, en 1898, un ouvrage beaucoup plus étendu : le *Traité de microbiologie*. Quatre volumes ont paru sur les sept projetés. Il fallait l'érudition et l'activité de Duclaux pour mener à bien cet énorme travail. Ce n'est pas seulement un traité ordinaire où sont présentés avec clarté et à leur place les travaux publiés sur le sujet, c'est aussi un livre original parce que, sur beaucoup de points, les idées énoncées appartiennent à Duclaux et sont appuyées sur ses propres recherches. Même quand il expose ce qui a été fait par d'autres, il fait œuvre personnelle. Du rapprochement et de la comparaison de plusieurs mémoires qui n'éclaircissent point le sujet, il sait tirer la conclusion véritable méconnue par les auteurs. Le second volume consacré aux Diastases et le troisième à la Fermentation alcoolique sont riches en aperçus originaux. Le cinquième volume, sur les Fermentations des matières azotées était écrit en partie lorsque Duclaux a succombé. Très au courant des recherches récentes sur les matières albuminoïdes, il s'était fait de leur constitution une idée simple qu'il croyait d'accord avec tous les faits. Ce *Traité* inachevé donne la plus haute idée de celui qui en a dressé le plan et qui n'a pas craint d'entreprendre à lui seul cette encyclopédie microbiologique.

Un des livres où se manifestent le mieux les qualités d'esprit de Duclaux est le *Cours de physique et de météorologie* professé à l'Institut agronomique. Il débute par un résumé des principes de la physique démontrée par des expériences simples. L'auteur s'attache à présenter des idées générales plutôt qu'à décrire des appareils. L'idée directrice de la partie météorologique est que les mouvements de l'air, depuis les plus grands jusqu'aux plus petits, sont dus à l'inégal échauffement de régions voisines. De ce principe le reste découle avec facilité. Ce livre a réconcilié bien des gens avec la météorologie, tant il est clair et attrayant.

Pasteur, histoire d'un esprit, a paru un an après la mort de Pasteur, en 1896. Cet ouvrage est digne de celui qui l'a inspiré. Il ne pouvait être écrit que par Duclaux qui avait suivi tous les travaux du maître en disciple dévoué et en penseur indépendant. Les découvertes pastoriennes s'y déroulent dans leur développement harmonieux. Mais on y voit aussi le savant aux prises avec les difficultés, évitant les obstacles et faisant tourner au profit de la vérité même ses erreurs momentanées. Après avoir lu cette analyse de son œuvre, on comprend mieux Pasteur et on le trouve encore plus grand.

L'Hygiène sociale est le dernier livre écrit par Duclaux. Il mérite d'être médité et par ceux qui gouvernent et par ceux qui sont gouvernés. La vérité y est dite sans complaisance avec une conviction persuasive. Duclaux y montre les vrais remèdes à opposer aux maladies qui minent notre civilisation. Il fait voir comment les découvertes de laboratoire deviennent des faits sociaux qui s'imposent aux gouvernants et aux législateurs. Avec une entière liberté de pensée, il fait le départ de ce que l'État peut déjà exiger et de ce qu'il est impuissant à imposer à nos mœurs. Ce dernier écrit de Duclaux est un chef-d'œuvre de bon sens dont ferait bien de s'inspirer un jour quelque législateur avisé.

Il faudrait encore de longues pages pour citer toutes les productions de ce grand laborieux, articles de vulgarisation, revues scientifiques. Toutes se distinguent par une pensée indépendante, présentée d'une façon inattendue, dans une langue vivante, imagée, sincère, qui est celle d'un grand écrivain. Aussi, rien de ce qu'il a écrit ne nous laisse indifférents.

Liste des publications scientifiques de E. Duclaux

FERMENTATIONS

Note sur la germination des corpuscules qui existent en suspension dans l'atmosphère. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1863, LVI, p. 1225.

Sur la fermentation alcoolique. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1864, LVIII, p. 1114.

Observation en réponse à une note de M. Millon relative à la fermentation alcoolique. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1864, LIX, p. 450.

Etudes relatives à l'absorption de l'ammoniaque et à la production d'acides gras volatils pendant la fermentation alcoolique. (Thèse pour le doctorat ès-sciences physiques.) *Ann. scient. de l'Ec. N. sup*re, 1re série, t. II, 1865, p. 249.

Fermentation alcoolique du lactose. *Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 573.

Fermentations et combustions solaires. *Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 751.

ÉTUDES SUR LES VERS A SOIE

De l'influence du froid de l'hiver sur le développement de l'embryon du ver à soie et sur l'éclosion de la graine. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1869, LXIX, p. 1021.

Recherches sur la respiration et l'asphyxie de la graine de vers à soie. *Ann. scient. de l'Ec. N. sup*re, 1869, 1re série, t. VI, p. 85, et *C. R. Ac. d. Sc.*, 1871, LXXIII, p. 826.

Sur un moyen de produire à volonté l'éclosion de la graine de vers à soie. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1871, LXXIII, p. 917.

Etudes physiologiques sur la graine de vers à soie. *Ann. de phys. et chim.*, 1871, 4e série, t. XXIV p. 290.

De l'action physiologique qu'exercent sur les graines de vers à soie des températures inférieures à zéro. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1876, LXXXIII, p. 1049.

Sur l'évolution des corpuscules dans l'œuf du ver à soie. *Ann. Inst. Past.*, 1895, VII, p. 885.

ÉTUDES SUR LE PHYLLOXERA, AGRICULTURE, ETC.

De l'influence de l'hiver sur les graines végétales. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1872, LXXIV, p. 802.

Notes relatives aux résultats obtenus dans ses études sur les ravages du phylloxera. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1872, LXXV, p. 834.

Sur la maladie de la vigne dans le sud-est de la France. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1872, LXXV, p. 722 et 1686.

Observations relatives au phylloxera vastatrix. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1872, LXXVI, p. 1451.

Sur un moyen d'arrêter les progrès de la maladie de la vigne. *Soc d'agr. hist. naturelle et actes utiles de Lyon*, 1874.

Pays vignobles atteints par le phylloxera en 1874. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1875, LXXX, p. 1085.

Traitement, par les sulfocarbonates, de la tache qui avait signalé l'apparition du phylloxera à Villié-Margon. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1875, LXXXI, p. 829,

Pays vignobles atteints par le phylloxera, 1877. *C. R. A. d. Sc.*, 1877, LXXXV, p. 1145.

Progrès du phylloxera dans le sud-ouest de la France. *C. R. A. d. Sc.*, 1877. LXXXV, p. 1206.

Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1885, C, p. 66.

Observations relatives à une note de MM. Th. Schlœsing et Em. Laurent sur la fixation de l'azote libre par les plantes. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1892, CXV, p. 735.

Les bactéries parasitaires des céréales. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1888, II, p. 621.

Le rôle agricole des microbes. *Revue scientifique*, 1893. t. LII p. 834.

Sur la fixation de l'azote atmosphérique. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1894, VIII, p. 728.

BACTÉRIOLOGIE

Influence de la lumière du soleil sur la vitalité des germes des microbes. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1885, C, p. 119.

Sur la vitalité des germes des microbes. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1885, C, p. 184.

Influence de la lumière du soleil sur la vitalité des micrococcus. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1885. CI, p. 395.

Action de la lumière sur les microbes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 88.

Les microbes du sol. *Revue critique, Ann. Inst. Past.*, 1887, I. p. 246.

Contribution à l'étude des besoins des bactéries en oxygène. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 311.

Etudes et recherches sur le barbone des bufles. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 400.

La scarlatine de lait à Londres, 1885. Observations sur une certaine maladie se produisant parmi les vaches au moment où leur lait disséminait la scarlatine, etc. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 453.

Sur les bactéries des eaux sulfureuses. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 548.

Sur l'absorption par inhalation des germes morbides. *Revue critique, Ann. Inst. Past.*, 1888, II, p. 32.

Mémoires sur le choléra Hog (choléra des poules). *Revue critique, Ann. Inst. Past.*, 1888, II, p. 387.

Sur les théories de l'immunité. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1888, II p. 494.

Sur le rôle des microbes dans la végétation *Revue critique. Ann. Inst. Past.* 1888, III, p. 82.

Les microbes des eaux. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1888, III, p. 559.
L'action de la lumière sur les microbes. *Revue scientifique*, 1887, t. XXXIX, p. 161.
Microbes, poisons et maladies. *Revue scientifique*, 1888, t. XLI, p. 65.
L'Ecole de Munich et l'Ecole de Berlin. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890 IV, p. 299.
Les Instituts bactériologiques en France et à l'étranger. *Revue scientifique*, 1891, t. XLVIII, p. 481.
Etude d'un microbe rencontré sur un malade atteint du clou de Biskra. *Bull. Ac. de Méd.*, 1884, 2e série, t. XIII, p. 743.

CHIMIE

Sur un hydrate de sulfure de carbone. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1867, LXIV, p. 10?9.
Sur l'iodure d'amidon. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1872, LXXIV, p. 533.
Sur les phénomènes présentés par l'iodure d'amidon. *Ann. d' phys. et chim.*, 1872, 4e série. t. XXV, p. 264.
Epaillage chimique de la laine. *Bull. Soc. chim.*, t. XXI, p. 337.
Sur un nouveau moyen de vérifier la pureté des corps volatils. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1885, CI, p. 1501.
Sur les transformations chimiques provoquées par la lumière solaire. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1886, CIII, p. 881.
Sur la préparation de l'acide valérianique pur. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1887, CV, p. 171.
Sur la migration des matières grasses. *Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 347.
Recherches des alcools de degré supérieur. *Ann. Inst. Past.*, 1888, II, p. 489.
Nouveau moyen d'éprouver la pureté des corps volatils. *Ann. de phy. et de chim.*, 1886, 6e série, t. VIII, p. 542.
Sur les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 423.
De la réaction de l'iode sur l'amidon. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1894, VIII, p. 863.

CHIMIE BIOLOGIQUE, ÉTUDES SUR LES VINS, ETC.

Sur un nouveau procédé pour l'étude et le dosage de l'alcool des vins. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1874, LXXVIII, p. 951.
Sur la matière colorante du vin. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1874, LXXVIII, p. 1159.
Sur les acides volatils du vin. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1874, LXXVIII, p. 1160.
Recherches sur les vins, 1er et 2e mémoires. *Ann. phys. et chim.*, 1874, 5e série, II, p. 233 et 289.
Recherches sur les vins, 3e mémoire. *Ann. phys. et chim.*, 5e série, III, p. 108.
Sur les ferments des matières albuminoïdes. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1880, XCI, p. 731.
Sur la digestion gastrique. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1882, XCIV, p. 736.
nSur la digestion pancréatique. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1882, XCIV, p. 808.
r la digestion intestinale. S *C. R. Ac. d. Sc.*, 1882, XCIV, p. 877.

Sur la digestion des matières grasses et cellulosiques. *C. R. Ac. d. Sc.* 1882, XCIV, p. 976.
Rapport sur le déplâtrage des vins. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1892, CXV, p. 152.
Sur une des réactions de la spermine. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1892, CXV, p. 155.
Sur une réaction donnée comme particulière à la spermine. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1892, CXV, p. 735.
De la durée de la vie chez les germes des microbes. *Ann. phys. et chim.*, 1885, 6e série, t. VIII, p. 542.
Microbiologie. (*Encyclopédie chimique, M. Frémy*) 1 vol. in-8o, 1883.
Action de la lumière solaire sur les substances hydrocarbonées. *Ann. de l'Inst. nat. agron.*, 1887.
Sur les diastases digestives : sucrase. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1888, II, p. 613.
Sur la digestion des matières grasses. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 126.
Sur le dosage des acides libres du suc gastrique. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1889, III. p. 183.
Sur les actions chimiques et microbiennes qui se produisent dans le sol. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, IV, p. 232.
Sur la sécrétion des diastases dans l'orge. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, IV, p. 607.
Action de l'électricité sur les microbes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, IV, p. 677.
L'alcool est-il un aliment? *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, IV, p. 745.
Action de la lumière sur les microbes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, IV, p. 792.
Sur l'état des acides pendant la digestion gastrique chez les nourrissons. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, V, p. 267.
Sur la digestion dans l'intestin grêle. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, V, p. 406.
Les matières albuminoïdes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, V, p. 712.
Sur la constitution des matières albuminoïdes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, V, p. 783.
Le lait considéré comme matière alimentaire. *Revue scientif.*, 1890, t. XLV, p. 578.
Phénomènes généraux de la vie des microbes. *Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 145.
Conservation des microbes. *Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 78.
Nutrition intracellulaire, 1er mémoire. *Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 97.
Conservation des levures. *Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 375.
Nutrition intracellulaire, 2e mémoire, *Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 413.
Formation des spores dans la levure. *Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 556.
Sur la différenciation des matières albuminoïdes. *Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 369.
Sur la cogulation du sulfate de quinine. *Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 657.
De l'influence du mouvement des liquides sur la multiplication des microbes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 55.

Sur la différenciation des matières albuminoïdes, *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 199.
Nucléo-albumines, globulines et albumines. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 274.
Études de chimie biologique. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 381.
Sur la coagulation. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, t. VI, p. 584.
Sur une fermentation pure de mannite et de glycérine. Fermentations produites par le pneumocoque de Friedlander. Fermentation pure de mannite et de dulcite. Décomposition de la mannite et du dextrose par le *bacillus ethaceticus*. Fermentation de l'arabinose par le *bacillus ethaceticus*. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 651.
Sur les actions coagulantes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1892, VI, p. 854.
Sur le mécanisme de la coagulation. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 57.
Sur l'étude chimique des aliments. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 676.
Sur l'étude chimique des aliments, les celluloses. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 786.
La distribution de la matière organique et des microbes dans le sol. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 823.
Sur la saccharification de l'amidon. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 56.
Les théories de la saccharification. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 120.
Amidons, dextrine et maltose. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 214.
Les laits stérilisés. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 281.
La digestibilité du lait stérilisé. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 352.
Sur l'origine des levures alcooliques. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 776.
Sur l'élection des aliments organiques. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 854.
Nutrition sans bactéries. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 896.
Sur les odeurs de putréfaction. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, X, p. 59.
Le pouvoir ferment et l'activité d'une levure. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, X, p. 119 et 177.
Digestion sans microbes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, X, p. 411.
Sur la structure des bactéries. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, X, p. 729,
Sur l'action des diastases. *Revue critique. Ann., Inst. Past.*, 1897, XI, p. 793.
Que savons-nous de l'origine des saccharomyces. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1898, XII, p. 156.
Sur les proenzymes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1898, XII, p. 407.
Sociologie et biologie. *Revue scientif.*, 1899, t. LXIV, p. 833.

TRAITÉ DE MICROBIOLOGIE. 1891 à 1901. 4 forts vol. in-8°.
Sur le rôle protecteur des microbes. *Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 305.
Sur le vieillissement des vins. *Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 537.
Sur la coagulation de l'albumine. *Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, 641.
Dosage des acides volatils. *Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 265.
Dosage des alcools. *Ann. Inst. Past.*, 1895, IX, p. 575.
Études sur l'action solaire. *Ann. Inst. Past.*, 1896, X, p. 129.
Lois générales de l'action des diastases. *Ann. Inst. Past*, 1898, XII, p. 96.

ÉTUDES SUR LE LAIT

Maturation et maladies du fromage du Cantal. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1877, LXXXV, p. 1171.
Fabrication, maturation et maladies du fromage du Cantal. Rapport à M. le ministre de l'Agriculture et du Commerce sur les travaux exécutés à la station laitière du Fau (Cantal) pendant l'année 1879. *Ann. Inst. nation. agron.*, 1880.
Deuxième rapport. *Ann. Inst., nation. agron.*, 1881.
Premier mémoire sur le lait. *Ann. Inst. nation. agron.* 1880.
Deuxième mémoire sur le lait. *Ann. Inst. nation, agron.*, 1884.
Troisième mémoire sur le lait. *Ann. Inst. nation. agron.*, 1886.
Sur les matières albuminoïdes du lait. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1884, XCVIII, p. 373.
Sur la constitution du lait. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1884, XCVIII, p. 438.
Action de la présure sur le lait. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1884, XCVIII, p. 526.
Études sur le beurre. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1884, CII, p. 1020.
Sur la rancissure du beurre, *C. R. Ac. d. Sc.*, 1884, CII, p. 1077.
Sur la composition des beurres de diverses provenances. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1887, CIV, p. 1727.
Sur les procédés de conservation du lait. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 30.
La chimie et l'industrie du lait, 1889. *Conférence faite à l'Exposition universelle internationale.*
Le lait et sa composition chimique. *Revue scientif.*, 1885, XXXV, p. 685.
PRINCIPES DE LAITERIE, 1892, 1 vol. in-12.
LE LAIT, ÉTUDES CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES, 1894, 1 vol. in-12.
Sur les phosphates du lait. *Ann. Inst. Past.*, 1893, VII, p. 2.
Sur le lait congelé. *Ann. Inst. Past.*, 1896, X, p. 393.

MÉDECINE ET HYGIÈNE

Carcinome et sarcome. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1882, II, p. 84.
FERMENTS ET MALADIES, 1882, 1 vol. in-8°.
LE MICROBE ET LA MALADIE, 1886, 1 *vol. in-8°.*
Action du soleil. *Revue d'hyg. et de pol. sanit.*, 1885, p. 237.
Alcools toxiques. *Revue d'hyg. et de pol. sanit.*, 1889, p. 88.
Le lait. *Revue d'hyg. et de pol. sanit.*, 1889, p. 357.
Sur la théorie des oscillations des eaux profondes. Rôle de la capillarité du sol dans le transport des bactéries, etc. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 134.

Sur la valeur de l'iodoforme comme antiseptique. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1887, I, p. 597.
Sur la désinfection des wagons ayant servi au transport des animaux. *Revue crit. Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 198.
Recherches sur la nourriture des nourrissons malades au moyen de lait stérilisé. *Revue crit. Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 570.
Influence de la ventilation sur les microbes en suspension dans l'air. *Revue crit. Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 616.
Sur les antiseptiques. *Revue crit. Ann. Inst. Past.*, 1889, III, p. 671.
Sur la contamination des puits. *C. R. Ac. d. S.*, 1892, CXXV, p. 913.
Sur l'action antiseptique de l'acide formique. *Ann. Inst. Past.*, 1892, p. 593.
Le filtrage des eaux, *Revue critique, Ann. Inst. Past.*, 1890, p. 41.
Action de l'eau sur les bactéries pathogènes. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, p. 109.
Sur les relations du sol et de l'eau qui le traverse. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, p. 172.
Sur la vitalité de divers microbes dans le lait. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1890, p. 185.
Sur la stérilisation du lait. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, p. 50.
Le filtrage des eaux de fleuve, *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, p. 257.
Sur quelques antiseptiques de la série aromatique. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1891, p. 617.
La purification spontanée des eaux de fleuve. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1894, p. 117.
La purification spontanée des eaux de fleuve. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1894, p. 178.
Moyens d'examen des eaux potables. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1894, p. 514.
Sur l'alimentation des nouveau-nés. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1894, p. 811.
La falsification des substances alimentaires. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, p. 244.
La falsification des substances alimentaires. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, p. 309.
La question de l'alcool. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, p. 358.
Réponse à M. Arm. Gautier à la suite d'une lettre de ce dernier, relative à la revue critique récemment publiée dans *Ann. Inst. Past.*, 1896, p. 244. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1896, p. 408.
Rapport présenté au nom de la sous-commission de l'hygiène à la commission extra-parlementaire du monopole de l'alcool. *Ann. Inst. Past.*, 1898, p. 73.
Rapport général sur les enquêtes concernant les eaux de source distribuées à Paris. *Ann. Inst. Past.*, 1900, 816.
L'alcool est-il un aliment? *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1902, p. 857.
Ce que c'est qu'un aliment. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1903, p. 307.
L'alcool et ses droits naturels. *Revue critique. Ann. Inst. Past.*, 1903, p. 770.
Antiseptiques. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1890, p. 74.

Lait stérilisé. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1891, p. 570.
Acide formique antiseptique. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1893, p. 156.
Lutte contre la diphtérie. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1895, p. 65.
Dosage des alcools. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1895, p. 1033.
Alcool et alcoolisme. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1896, p. 727.
Lait congelé. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1897, p. 266.
Contamination des puits. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1898, p. 64.
Cours d'hygiène sociale. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1901, p. 93.
Eaux de sources. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1901, p. 298.
Eaux de sources. *Revue d'hygiène et de pol. sanit.*, 1901, p. 334.
L'Hygiène sociale, 1902, 1 vol. in-8°.
Études d'hydrographie souterraine. *Ann. Inst. Past.*, 1903, p. 523, 640, 857. id. 1904, p. 121, 197, 269.

PHYSIQUE

Sur la formation des gouttes liquides. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1870, LXX, p. 933.
Sur les lois des mouvements d'écoulement des liquides dans les espaces capillaires. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1872, LXXIV, p. 368.
Sur la séparation des liquides mélangés et sur de nouveaux thermomètres à maxima et à minima. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1875, LXXXI, p. 815.
Sur la tension superficielle des solutions aqueuses d'alcools et d'acides gras. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1877, LXXXV, p. 1068.
Sur les forces élastiques des vapeurs émises par un mélange de deux liquides. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1878, LXXXVI, p. 592.
Sur les phénomènes qui accompagnent la couronne solaire. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1884, XCIX, p. 714.
Études actinométriques. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1886, CIII, p. 1010.
Sur les actions comparées de la chaleur et de la lumière solaire. *C. R. Ac. d. Sc.*, 1887, CIV, p. 294.
Sur la tension superficielle des liquides. *Ann. phys. et chim.*, 1870, 4e série, t. XXI, p. 378.
Recherches sur les lois des mouvements des liquides dans les espaces capillaires. *Ann. phys. et Chim.*, 1872, 4e série, t. XXV, p. 433.
Sur la séparation des liquides mélangés. *Ann. Phys. et chim.*, 1876, 5e série, t. VII, p. 264.
Sur la tension superficielle dans la série des alcools et des acides gras. *Ann. phys. et chim.*, 1878, 5e série, t. XIII, p. 76.
Sur les forces élastiques des vapeurs émises par les mélanges de deux liquides. *Ann. phys. et chim.*, 1878, 5e série, t. XIV, p. 305.
De l'influence de la tension superficielle sur les mesures aérométriques. *Journal de physique*, 1872, p. 197.
Théorie élémentaire de la capillarité. *Journal de physique*, 1872, p. 350.
Équilibre des mélanges liquides. Nouveaux thermomètres à minima et à maxima. *Journal de physique*, 1876, p. 13.
Cours de physique et de météorologie, 1891, 1 vol. in-8°.

DIVERS

Louis Pasteur. *Ann. Inst. Past.*, 1895, p. 745.

Le laboratoire de M. Pasteur et l'École normale. *Revue scientifique*, 1895, t. LV, p. 449.

L'œuvre de Pasteur. *Rev. scient.*, 1895, t. LVI, p. 641.

Pasteur, histoire d'un esprit 1896, 1 vol. in-8°.

Discours prononcé aux funérailles de M. J. Bertrand, au nom de l'Institut Pasteur. *C. R. Ac. d. Sc.* 1900, CXXX, p. 972.

Préface du Bulletin de l'Institut Pasteur, 1903.

L'enseignement des mathématiques. *Revue scientifique*, 1899, t. LXIII, p. 353.

Discours prononcé à l'inauguration de l'Institut Pasteur de Lille, 1899.

Le Sérum antistreptococcique et son mode d'action

Par le Dr BESREDKA

(Laboratoires de MM. Metchnikoff et Roux.)

Le sérum antistreptococcique, quoique entré depuis déjà une dizaine d'années dans la thérapeutique humaine, est loin d'y avoir acquis le droit de cité. Tout au contraire, depuis sa découverte, jamais il n'a soulevé tant de discussions qu'en ces temps derniers. Le fait est que, outre les imperfections que ce sérum partage avec la majorité des sérums antimicrobiens, il a un point faible, qui lui appartient en propre et qui dérive de l'incertitude qui plane de tout temps sur la nature même du streptocoque.

Marmorek, qui s'est occupé beaucoup de la sérothérapie antistreptococcique, soutenait, même jusqu'à ces temps derniers, que tous les streptocoques, d'où qu'ils viennent, appartiennent à une seule et même espèce.

Cette opinion, sans être unanime, a été celle que l'on enseignait généralement : dans les traités aussi bien que dans les cours de bactériologie, on parlait couramment *du* streptocoque.

Aujourd'hui, c'est l'opinion contraire qui semble être en faveur; il paraîtrait qu'il n'y a pas deux streptocoques qui se ressemblent; non seulement au cours de maladies différentes, mais dans une seule maladie, cliniquement bien déterminée, telle que la scarlatine, les streptocoques seraient différents les uns des autres.

On conçoit aisément qu'une divergence aussi profonde d'opinions n'est pas sans avoir eu une répercussion sur la sérothérapie antistreptococcique, et voici pourquoi celle-ci a mis tant d'années à se frayer un chemin dans la clinique.

Il n'est pas douteux que nos connaissances sur la biologie du streptocoque sont encore imparfaites; il n'en est pas moins certain que la tendance actuelle de voir partout et toujours des streptocoques variés est aussi peu fondée que l'opinion des

unicistes hypnotisés par la ressemblance morphologique de cocci en chaînettes.

Il en est, d'après nous, des streptocoques comme des vibrions et des spirilles. Le streptocoque n'est qu'une expression de la forme de microbes dont il existe plusieurs variétés, aussi distinctes peut-être que le sont le vibrion cholérique et le *vibrio Metchnikovi*, par exemple.

Le problème qui se pose aujourd'hui est de trouver les moyens permettant d'individualiser les streptocoques ; c'est là, pensons-nous, l'avenir de la sérothérapie antistreptococcique, et tant que ce problème ne sera pas résolu, on sera réduit à des tâtonnements et à de l'empirisme plus ou moins réussi.

Nous reviendrons sur ce sujet à la fin de cet article.

* * *

La question du milieu a été, pour le streptocoque, toujours une de celles qui préoccupaient le plus les bactériologistes. Marmorek, qui essaya un grand nombre de milieux, s'arrêta finalement au bouillon-ascite. Plus près de nous, Aronson, auquel nous devons le sérum le plus actif jusqu'à présent connu, se sert de bouillon glucosé, milieu excellent, mais fort capricieux, nous disait-il. D'autres bactériologistes ont employé des milieux plus ou moins compliqués, mais toujours à base de bouillon.

Guidé par certaines considérations sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement, nous avons résolu de déroger à cet usage et d'opérer, autant que possible, sur des streptocoques cultivés en milieu solide. Or, sur gélose, le streptocoque forme des colonies très petites et souvent, comme c'est le cas pour le microbe de Marmorek, c'est à peine si l'on distingue une trace de culture. Il a fallu cependant, pour immuniser les chevaux, avoir de grandes quantités de corps microbiens.

Pour cela, nous avons eu recours au procédé suivant.

Tous les échantillons de streptocoques — et nous en possédons plus de 40 — sont ensemencés et conservés dans un mélange à parties égales de bouillon Martin et de sérum chauffé (56° — 1/2h.) de cheval ; dans ce milieu les streptocoques restent longtemps vivants et conservent très bien leur virulence. Après s'être ainsi habitués à vivre en présence du sérum, les strepto-

coques poussent ensuite très abondamment sur de la gélose que l'on a eu soin d'arroser préalablement avec un peu de sérum de cheval.

Nous faisons nos cultures dans des boîtes de Roux, ayant 22 centimètres de longueur sur 11 centimètres de largeur. Une heure avant de procéder à l'ensemencement, on ajoute dans chaque boîte de gélose 1-1,5 c. c. de sérum chauffé de cheval; sur une gélose ainsi préparée, puis largement ensemencée, on a, 24 heures après, une culture si riche que, pour être injectée dans les veines d'un cheval, elle a besoin d'être diluée dans 100 c. c. environ d'eau physiologique.

Ce milieu de *gélose sérum*, tout en fournissant une grande quantité de corps microbiens, offre cet avantage qu'il permet un dosage assez précis du virus injecté, ce qui n'est pas à dédaigner, vu la sensibilité extrême des chevaux aux *injections intraveineuses*, les seules que nous pratiquons pour les immuniser.

***

A chaque injection nous introduisons de 6 à 8 différents streptocoques dont tous, sauf un seul, ont été isolés dans de streptococcies humaines (scarlatine, érysipèle, fièvre puerpurale, phlegmon, septicémie, etc.). Ces streptocoques de provenance humaine, étant généralement peu pathogènes pour les animaux de laboratoire, ne peuvent guère servir au dosage du sérum; c'est pourquoi nous leur avons adjoint un streptocoque qui, par des passages successifs, était rendu très virulent pour la souris et pour le lapin.

En admettant — ce n'est qu'une hypothèse — que le cheval s'immunise d'une façon à peu près égale vis-à-vis de tous les streptocoques qu'on lui inocule, il y a lieu d'espérer que le streptocoque virulent, qui a fait des passages, pourrait servir en quelque sorte d'indicateur de l'état d'immunité du cheval vis-à-vis de la totalité des streptocoques.

Chaque injection est suivie d'une forte réaction thermique (plus de 40°) qui, du reste, ne se maintient pas longtemps; après 48 heures, tout rentre dans l'ordre.

Mais, de temps à autre, on observe ceci : un cheval qui paraissait complètement rétabli, est de nouveau pris de fièvre,

10-15 jours après l'injection. Tantôt il accuse des troubles articulaires, tantôt il présente des phénomènes inflammatoires à quelque distance des articulations. Dans ce dernier cas on voit apparaître dans l'épaisseur des muscles un liquide séreux qui finit par se frayer un passage au dehors. L'animal maigrit et pendant des semaines il est hors de service. Dans un cas, le cheval est mort après quelques jours seulement de maladie; à l'autopsie faite par M. Frasey, médecin-vétérinaire de l'Institut Pasteur, on a trouvé les muscles de la région malade infiltrés de masses gélatineuses baignant dans un liquide séreux absolument stérile. Les mêmes altérations ont été observées chez un autre cheval qui, pris des mêmes symptômes, avait été abattu.

Ces accidents, dont les causes nous échappent et qui peuvent survenir à tous les stades d'immunisation, sont liés, évidemment, au mode d'inoculation; mais, si ce dernier procure des déboires, il offre aussi des avantages précieux, car il permet, en peu de temps relativement, d'obtenir un sérum doué de propriétés préventives et curatives très marquées.

***

Voici quelques chiffres pour donner une idée du pouvoir thérapeutique de notre sérum.

Les dosages ont été faits sur des souris et sur des lapins.

Une souris inoculée sous la peau avec une dose plus de dix fois mortelle de streptocoques, peut être sauvée si on lui injecte *18-24 heures après* 1/1000 c. c. de sérum dans le péritoine. Avec 1/40 — 1/400 c. c. de sérum on peut préserver dans les mêmes conditions contre une dose au moins 2,000 fois mortelle. La dose mortelle, prise comme unité, a été dans nos expériences égale à 1/16000000 c. c. de culture de 24 heures en bouillon-sérum; en réalité, on pourrait tuer une souris avec une dose beaucoup plus faible; mais nous nous sommes arrêtés au chiffre indiqué pour éviter de trop grandes dilutions.

Quant à l'effet préventif du sérum, il a été déjà manifeste avec des doses dix fois inférieures à celles qui étaient nécessaires pour obtenir un effet curatif.

Chez les lapins, il faut employer des doses plus fortes de

sérum ; ainsi, après avoir inoculé sous la peau d'un lapin une dose de streptocoque plus que 100 fois mortelle (1/40,000 c. c.), on peut le sauver sûrement en lui injectant deux heures après, dans les veines ou dans le péritoine, 1,5 à 2 c.c. de sérum.

Ces chiffres ne sont pas définitifs; nous ne sommes pas encore arrivé au terme de l'immunisation, et nous espérons avoir sous peu des sérums plus actifs.

***

Nous passons sur les propriétés agglutinantes du sérum sur lesquelles nous comptons revenir une autre fois pour nous arrêter sur ses propriétés fixatrices ou sensibilisatrices.

Le sérum antistreptococcique est, jusqu'à présent, à peu près le seul dans lequel on n'ait pas constaté la présence de fixateur. Aronson a voulu se rendre compte de la manière dont agit son sérum ; après avoir mis le sérum en contact avec des streptocoques, il a pu s'assurer qu'il est resté après cela aussi actif qu'avant : les streptocoques n'ont donc rien fixé.

Grâce à l'obligeance de M. Aronson qui a bien voulu nous envoyer du sérum pur, non additionné de tricrésol, ainsi que son streptocoque, nous avons pu faire l'épreuve de Bordet-Gengou et nous assurer que, réellement, le sérum d'Aronson ne contenait que des traces de fixateur vis-à-vis de son propre streptocoque. Ce dernier, mis en présence du sérum spécifique et de la cytase (alexine), a laissé cette dernière à peu près complètement libre, de sorte que les globules sensibilisés, ajoutés quelque temps après, se sont dissous presque aussi bien que dans les tubes témoins, contenant du sérum normal.

Cette expérience fut répétée plusieurs fois et toujours avec les mêmes résultats.

Or, chose curieuse, le fixateur antistreptococcique que nous avons vainement cherché dans le sérum d'Aronson, est toujours présent dans tous les échantillons de notre sérum.

Cette différence doit tenir, évidemment, à ce que notre mode d'immunisation diffère de celui d'Aronson : d'abord, les chevaux d'Aronson sont immunisés avec des cultures en bouillon, alors que les nôtres reçoivent des cultures provenant du raclage de boîtes de gélose-sérum; puis, nous injectons toujours les microbes directement dans les veines, alors qu'Aronson, autant

que l'on peut juger d'après son mémoire, s'adresse de préférence à la voie sous-cutanée.

Les expériences ultérieures vont élucider cette question.

Ce qui nous intéresse en ce moment, ce n'est pas tant de connaître la ou les causes qui président à la production du fixateur que de se rendre compte du rôle que celui-ci joue dans les sérums spécifiques.

Ce rôle justifie-t-il le terme de « substance immunisante », ou « d'immuncorps » sous lequel le désignent généralement les auteurs allemands?

Nous ne le pensons pas, et voici pourquoi.

Si le fixateur représentait réellement la substance active du sérum, celle qui lui confère son action spécifique, on aurait dû s'attendre à ce que le sérum d'Aronson, qui est presque dépourvu de fixateur, fût aussi presque dépourvu de propriétés préventives.

Or, ce sérum est sûrement très actif vis-à-vis du streptocoque d'Aronson et, sous ce rapport, nos expériences confirment en tous points les résultats annoncés par cet auteur.

Il y a donc dans le sérum d'Aronson autre chose que le fixateur ou « l'immuncorps » qui permet à l'animal de lutter avec succès contre les streptocoques.

Que le fixateur n'est pas tout dans un sérum spécifique cela ressort encore de l'observation suivante que nous avons eu l'occasion de vérifier à plusieurs reprises.

Afin de nous rendre compte de la marche de l'immunisation de nos chevaux, nous faisions de temps à autre de petites saignées d'essai ; à chaque saignée on essayait le sérum au point de vue de ses propriétés préventives, ainsi qu'au point de vue de sa teneur en fixateur, par le procédé de Bordet-Gengou.

Or, aucun parallélisme n'a pu être constaté entre ces deux propriétés dans les divers échantillons de nos sérums.

En plus, en examinant comparativement le sérum d'Aronson avec les échantillons des premières saignées, nous avons vu que ces derniers, tout en contenant le fixateur, étaient quatre fois moins actifs que le sérum d'Aronson qui en contenait des traces seulement.

Un sérum peut donc être actif sans renfermer de fixateur, et il peut renfermer le fixateur sans pour cela être bien actif.

Quel est le rôle de ce fixateur, nous l'ignorons pour le moment, mais, ce qui est certain c'est que l'animal n'en a pas besoin pour venir à bout des streptocoques.

***

Comment agit donc le sérum?

Il n'est pas bactéricide ; c'est un fait établi depuis longtemps.

Il n'a pas besoin d'être sensibilisateur, nous venons de le montrer.

Il n'exerce donc pas d'action *directe* sur les streptocoques.

Pour se rendre compte du mécanisme de cette action, on n'a qu'à regarder, microscope et pipette en mains, ce qui se passe *in vitro*. C'est ce que fit si bien Bordet en 1897 en se servant du sérum de Marmorek. Cette même question fut reprise récemment par Aronson pour son propre sérum. Nous-mêmes venons d'étudier le mécanisme de l'immunité passive en nous servant de sérum riche en fixateur.

Quel que soit le sérum, le mécanisme de son action est toujours le même : les phagocytes interviennent si vite après l'infection et opèrent un englobement si parfait des streptocoques que l'action du sérum sur les leucocytes ne peut pas être mise en doute.

Certes, on peut admettre que le sérum agit en raison de son pouvoir antitoxique, mais cette hypothèse n'a pour elle aucun fait expérimental. Étant donné notre mode d'immunisation par les corps microbiens, ne renfermant pas de toxine, il est peu admissible que ceux-ci produisent de l'antitoxine ; quant au sérum d'Aronson, préparé avec des cultures en bouillon dont les filtrats ne sont que très peu toxiques, l'hypothèse d'une action antitoxique est aussi peu probable ; elle n'est même pas soulevée par l'auteur.

Il ne reste donc qu'une seule interprétation possible qui s'accorde, du reste, très bien avec les données microscopiques et d'après laquelle la survie des animaux traités par le sérum est due à l'action stimulante que ce dernier exerce sur les globules blancs.

Cette interprétation trouve une confirmation indirecte dans le fait que nous avons signalé déjà, en passant, à savoir que le sérum agit différemment selon l'espèce animale. Ainsi, nous

possédons un streptocoque vis-à-vis duquel la souris et le lapin sont à peu près également sensibles. Or, tandis que pour protéger la souris contre une dose 100 fois mortelle de streptocoques, il suffit d'injecter 1/200 c. c. de sérum, une dose beaucoup plus élevée — 1,5-2 c. c. — de ce dernier est nécessaire pour obtenir le même effet chez le lapin, inoculé avec le même nombre de microbes.

Si le sérum devait son pouvoir curatif à l'action qu'il exercerait *directement* sur la toxine streptococcique ou sur les corps de streptocoques ne serait-on pas en droit de s'attendre à ce que l'effet du sérum fût le même qu'il s'agisse de lapins ou de souris ?

Si ce n'est pas une preuve, c'est au moins un argument en plus en faveur de l'action indirecte du sérum.

***

Au commencement de cet article, il a été question de la multiplicité des streptocoques et de la nécessité qu'il y a, ne fût-ce que dans l'intérêt de la sérothérapie, de pouvoir établir une classification rationnelle.

Ni l'origine, ni les caractères culturaux, ni l'aspect microscopique, ni l'action pathogène ne fournissent d'éléments nécessaires pour ébaucher cette classification.

Aujourd'hui, chaque fois que l'on isole un streptocoque, que cela soit chez l'homme ou les animaux, à l'état normal ou au cours d'une affection grave, on est extrêmement embarrassé de dire si l'on se trouve en présence d'une nouvelle espèce ou d'un microbe déjà vu. Pour apporter un semblant d'ordre, on classe souvent les streptocoques d'après les maladies où on les avait rencontrés; il est à peine besoin d'ajouter combien cette classification est illusoire.

On a pensé que l'agglutination pourrait fournir un critérium plus sûr; mais de ce côté aussi il n'y a pas beaucoup à espérer, du moins pour le moment.

L'agglutination a été tour à tour invoquée pour plaider la parenté étroite de tous les streptocoques, de même que pour soutenir la thèse contraire, soit la spécificité de certains d'entre eux, et cela parce que l'agglutinine streptococcique n'est pas

comparable aux autres et ne se prête pas, comme l'agglutinine typhique, par exemple, à un dosage rigoureux.

D'abord, les streptocoques poussent souvent en amas qui ont à subir une désagglutination préalable, et, comme celle-ci n'a rien d'absolu, elle varie nécessairement avec chaque expérimentateur. Ensuite, le titre agglutinatif d'un sérum antistreptococcique peut varier, dans une large mesure, pour le même streptocoque, selon la virulence qu'il présente à un moment donné (Neufeld); de plus, le titre agglutinatif peut subir d'importantes variations, jusqu'à disparaître même, en présence de certaines substances (Weaver, Aronson). Bref, à l'heure actuelle, avec la technique que nous possédons, l'agglutination ne semble pas en état d'éclairer la question de l'individualité des streptocoques.

On sera peut-être plus heureux en s'adressant au phénomène de fixation.

Au cours de nos recherches sur les fixateurs dans les sérums antistreptococciques, nous avons employé, en plus des streptocoques ayant servi à l'immunisation, différents autres échantillons, à titre de contrôle.

En combinant de différentes façons sérums et streptocoques, nous avons acquis la conviction que les fixateurs sont rigoureusement spécifiques : un cheval immunisé avec un streptocoque déterminé *A* contient seulement le fixateur lui correspondant *A*″; vis-à-vis de tout autre streptocoque que *A*, le sérum de ce cheval se comporte comme un sérum normal, c'est-à-dire donne une réaction négative.

Telle est la règle générale; mais elle n'est pas absolue. Dans le nombre de streptocoques témoins, il est facile d'en trouver un ou deux (*B*, *C*) qui, mis en contact avec le fixateur *A*, se comportent tout à fait comme le streptocoque *A*.

Étant donnée la spécificité bien démontrée des fixateurs, il reste à conclure que ces nouveaux échantillons (*B*, *C*) sont identiques au streptocoque *A* ou, pour ne pas nous avancer trop, nous dirons qu'ils en sont très voisins.

C'est de cette façon que nous avons pu établir l'identité ou la parenté de trois streptocoques de provenance très différente, que jusqu'à ce jour nous considérions comme n'ayant rien de commun entre eux.

Un de ces streptocoques fut isolé par M. Roux du liquide

d'œdème chez un enfant mort de *septicémie* streptococcique; c'est avec ce streptocoque que nous avons immunisé un cheval; des deux autres streptocoques qui ont réagi spécifiquement vis-à-vis de ce même fixateur, un a été isolé du sang d'une femme morte d'*érysipèle* à l'hôpital Pasteur (strept. Girard-Loiseau), et l'autre nous a été très obligeamment envoyé de Vienne par M. Jellinek; il a été isolé du sang du cœur d'un enfant mort de *scarlatine.*

Ces trois streptocoques, isolés à des époques différentes, ont été cultivés depuis longtemps dans les mêmes milieux artificiels que tous les autres streptocoques; rien, dans leurs caractères biologiques, ni morphologiques, ne faisait prévoir la parenté entre ces trois échantillons, pas plus qu'entre ces derniers et les autres streptocoques de la collection.

On aurait donc dans le phénonène de fixation [1] un moyen de différenciation très sensible qui permettrait de mettre un peu d'ordre dans cette question si importante de biologie et de médecine clinique.

C'est dans cette direction que vont être dirigés nos efforts.

1. La réaction est très facile à réaliser : on mélange 20 gouttes de sérum chauffé avec 4-6 gouttes de cytase et 15 à 20 gouttes d'émulsion assez épaisse de streptocoques dans l'eau physiologique; après 4-5 heures de contact, on ajoute des globules sensibilisés; pour les détails, voir le travail de Bordet et Gengou (Ces *Annales*, t. XV, p. 289). Rappelons que, si le streptocoque est déjà hémolytique à lui seul, il faut le chauffer à 60° pendant 1 heure; mais, s'il n'hémolyse pas, il est de beaucoup préférable de se servir de streptocoques vivants qui fixent notablement mieux que les chauffés. Les streptocoques proviennent dans nos expériences de cultures sur gélose-sérum.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU ROLE DES STREPTOCOQUES AU COURS DE LA SCARLATINE

Par MM. BESREDKA et DOPTER

La présence de streptocoques dans la scarlatine a été de tout temps considérée comme un fait banal, et bien rares étaient ceux qui voulaient y voir autre chose qu'une simple association microbienne.

La communication bien connue de Moser[1] au Congrès de Carlsbad fut de nature à ébranler sérieusement cette manière de voir; devant les beaux résultats thérapeutiques de son sérum anti-scarlatineux, nombre de bactériologistes ont fini par se demander si, dans leur dédain pour les chaînettes si souvent rencontrées dans la gorge ou le sang du cœur de scarlatineux, ils n'étaient pas passés à côté de l'agent pathogène de la scarlatine, ou du moins, d'un des agents les plus importants de cette affection. Et l'on eut beau se dire que la scarlatine avait des caractères trop bien définis pour être causée par un streptocoque, les témoignages de cliniciens, comme Escherich et Bokay, furent si éloquents que la question de spécificité du streptocoque scarlatineux a gagné beaucoup de terrain.

Donc, d'une part, fréquence incontestable du streptocoque au cours de la scarlatine, d'autre part, action spécifique du sérum préparé avec les streptocoques de la scarlatine, à l'exclusion de tout autre, tels sont les faits que Moser et ses partisans invoquent en faveur de la spécificité.

Mais, pour être réellement démonstrative, cette thèse aurait besoin de s'appuyer sur d'autres preuves, notamment sur celles que l'on a l'habitude d'apporter chaque fois qu'il s'agit de démontrer l'identité d'un microbe nouveau ; nous voulons parler de la séro-réaction sous ses différentes formes.

Une des réactions les plus sensibles et les plus précieuses pour l'identification d'un microbe est, sans contredit, l'agglutination ; dans l'immense majorité des maladies, spontanées ou expérimentales, le passage du microbe pathogène dans l'organisme

1. P. Moser, *Wiener klin. Woch.*, n° 41, 9 oct. 1902; pp. 1053-1055.

est marqué, tôt ou tard, par l'apparition, dans le sang, de la réaction agglutinante : cette dernière est d'une sensibilité telle qu'elle révèle parfois la présence d'un microbe, même étranger à l'affection principale; tel est, par exemple, le cas du sérum des varioleux qui agglutine le streptocoque, satellite du microbe de la variole (de Waele).

Si donc le streptocoque qu'on rencontre dans la scarlatine jouait réellement le rôle important que lui attribue Moser, on aurait pu s'attendre à voir le sérum de scarlatineux doué d'un pouvoir agglutinant bien manifeste vis-à-vis de ce germe. Or, les nombreuses expériences de Moser lui-même et de v. Pirquet [1], les observations consciencieuses et variées de Weaver [2], enfin, celles toutes récentes de l'un de nous [3] prouvent surabondamment qu'à aucun stade de la maladie le sérum de scarlatineux n'agglutine d'une manière spécifique les streptocoques recueillis chez ces malades. A part Salge qui a constaté une agglutination notable avec le sérum de scarlatineux, aucun des auteurs précédents n'a pu constater de différence nette à cet égard entre les streptocoques de la scarlatine et les autres streptocoques d'origine variée.

La recherche du pouvoir agglutinant vis-à-vis du streptocoque et surtout son appréciation ne sont pas sans présenter des difficultés, car bien souvent ce microbe pousse agglutiné dans les cultures, et pour pratiquer la réaction, il faut commencer par le désagglutiner, ce qui peut être obtenu de plusieurs façons. Ce traitement préliminaire rend naturellement difficile le dosage du titre agglutinatif du sérum, et les résultats notés par différents auteurs ne sont plus comparables entre eux. Weaver a particulièrement insisté sur ces causes d'erreur.

En présence de ces faits, nous avons pensé que la question serait peut-être plus facilement résolue par la recherche du fixateur (sensibilisatrice), au moyen du procédé devenu classique de Bordet et Gengou. Ce procédé d'une sensibilité remarquable a permis à ces auteurs de mettre en évidence dans différents sérums, les fixateurs pour le bacille typhique, le bacille de la peste, le bacille du rouget, etc.

1. Moser et v. Pirquet, *Centralbl. f. Bacter.*, I., Orig., t. XXXIV; pp. 560; 714.
2. Weaver, *Journ. of infect. diseases*, vol I, pp. 91-106; 1904.
3. Dopter, *Société de Biologie*, 14 mai 1904.

Or, les expériences de l'un de nous, exposées dans un mémoire précédent[1], ont montré que les animaux qui ont reçu en inoculation des cultures de streptocoques, ne font pas exception à la règle générale et qu'un pareil sérum peut aussi contenir un fixateur facile à mettre en évidence.

Dès lors nous pouvions nous demander si le sérum de scarlatineux ne contiendrait pas, lui aussi, une sensibilisatrice vis-à-vis du streptocoque de la scarlatine.

Le résultat positif serait, à n'en pas douter, la preuve évidente de l'intervention spécifique de ce germe dans l'étiologie de l'affection; il faut ajouter cependant qu'un résultat négatif ne serait pas de nature à infirmer complètement la thèse de Moser, car, même dans le sérum des chevaux longuement immunisés contre le streptocoque, nous avons vu le fixateur faire quelquefois défaut.

Cette restriction faite, résumons brièvement nos expériences.

Nous avons examiné le sérum de sept malades ayant présenté une scarlatine typique, terminée par guérison :

Obs. I. — Lang... Scarlatine à caractère grave. Forme nerveuse; rachialgie; hyperesthésie généralisée. Pseudo-rhumatisme. Fièvre ayant persisté 13 jours à partir du début.

Sérum prélevé le 30e jour, en pleine convalescence.

Obs. II. — Lar. . Scarlatine d'intensité moyenne. Pseudo-rhumatisme. 12 jours de fièvre.

Sérum prélevé le 32e jour.

Obs. III. — Met... Scarlatine d'intensité moyenne. Albuminurie prolongée dans les premiers jours. Forme nerveuse : délire, agitation, 6 jours de fièvre modérée.

Sérum prélevé le 23e jour.

Obs. IV. — Mach... Scarlatine de moyenne intensité. Forme nerveuse : agitation, délire, vertiges. Pseudo-rhumatisme; 10 jours de fièvre modérée.

Sérum prélevé le 12e et le 27e jour.

Obs. V. — Lav... Scarlatine de forme moyenne. 7 jours de fièvre modérée.

Sérum prélevé le 17e et le 33e jour.

Obs. VI. — Desch... Forme bénigne. 3 jours de fièvre légère.

Sérum recueilli le 7e jour.

Obs. VII. — Mil... Forme grave, nerveuse. Pseudo-rhumatisme.

Sérum recueilli le 10e et le 25e jour.

Nous avons donc ainsi utilisé du sérum prélevé aux 7e, 10e,

1. Voir dans ce même fascicule : Le sérum antistreptococcique et son mode d'action.

12e, 17e, 23e, 25e, 27e, 30e, 32e, 33e jours; de plus, chez trois malades, le sang a été examiné trois fois, à quinze jours d'intervalle : les divers échantillons de sérum ont donc été prélevés à différents stades de la maladie. En outre, pour avoir un terme de comparaison, du sérum a été recueilli chez trois malades convalescents de pleurésie tuberculeuse, d'angine simple et d'érysipèle, et n'ayant jamais eu de scarlatine antérieure.

Tous les échantillons de sérum étaient préalablement chauffés à 56° pendant une demi-heure, puis conservés à la glacière.

Les streptocoques dont nous nous sommes servis, ont été cultivés sur gélose-sérum (voir le mémoire précédent).

Dans une première série d'expériences, les races de streptocoques employés (n° III et n° VII)[1] étaient isolées du sang du cœur de personnes mortes de scarlatine; dans une deuxième série, nous avons employé les streptocoques isolés des malades mêmes qui nous ont fourni le sérum.

Avant chaque expérience, on s'assurait que les streptocoques ne dissolvaient pas, à eux seuls, les globules rouges de lapin; pour la grande majorité de nos cultures, ce n'était pas le cas, au moins dans nos conditions d'expérience, c'est-à-dire qu'ils n'hémolysaient pas à la température du laboratoire, dans l'espace de 18 à 24 heures. Dès qu'on remarquait dans une culture une tendance à l'hémolyse, on faisait une expérience de contrôle avec la même culture, chauffée à 60° pendant une heure.

La cytase (alexine), nécessaire pour la réaction de fixation, était fournie par du sérum de cobaye saigné de la veille.

Nous avions l'habitude d'employer pour chaque sérum et chaque variété de streptocoques plusieurs tubes dans lesquels on plaçait des quantités variables de cytase (4 à 7 gouttes). La quantité de sérum humain dans lequel on recherchait le fixateur, était toujours la même : 20 gouttes; quant à la culture, le nombre de gouttes ajoutées variait de 10 à 20, suivant sa richesse.

Après cinq heures de contact entre le sérum humain à essayer, la cytase et les streptocoques, nous ajoutions des globules sensibilisés de lapin.

La réaction ne se faisait généralement pas longtemps attendre:

1. Ces streptocoques nous ont été gracieusement fournis par les docteurs Jellinek et R. Kraus, de Vienne ; nous sommes très heureux de saisir cette occasion pour leur exprimer notre profonde reconnaissance.

après un quart d'heure environ, les résultats se dessinaient déjà très nettement ; ils devenaient encore plus accentués dans les heures suivantes.

Ces résultats peuvent être résumés de la façon suivante : dans aucun des échantillons de sérum provenant de malades atteints de scarlatine et en voie de guérison, il n'a été possible de constater la présence de fixateur, ni vis-à-vis de streptocoques isolés du sang du cœur, chez des personnes mortes de scarlatine, ni vis-à-vis de leur propre streptocoque, isolé de la gorge.

Le streptocoque que l'on rencontre dans la scarlatine, ne paraît donc pas être spécifique de cette infection ; il n'y intervient, probablement, qu'à titre d'agent d'association secondaire.

Sur l'isolement de la zymase dans les tissus animaux et végétaux

Par P. MAZÉ.

J'ai établi que l'on peut isoler la zymase du mycélium jeune d'*Eurotiopsis Gayoni* développé en voile superficiel, en large contact avec l'air[1]; j'ai montré également que ce mycélium privé d'air pendant 24 à 48 heures ne s'enrichit pas en zymase comme la levure.

Ces faits démontrent que cette diastase se forme en vie aérobie et qu'elle est indispensable à l'assimilation du sucre.

M. Stoklasa et ses collaborateurs ont isolé récemment la zymase des végétaux et des tissus animaux[2].

Comme j'avais eu déjà l'occasion d'examiner cette question et de constater qu'une simple dessiccation dans le vide des graines de pois fermentés, ou des plantules de pois ou de maïs frais ou préalablement privés d'air pendant 48 heures et plus, suffit pour détruire la zymase qu'ils renferment, j'ai repris les expériences de M. Stoklasa et Czerny en suivant les indications qu'ils fournissent dans leur premier mémoire.

Mes essais ont porté sur des graines de pois placées sous l'eau à 30° pendant 48 heures : 5 kilogrammes; des plantules de pois dont on employait seulement les tiges longues de 5-10 centimètres : 500 grammes à l'état frais, — 500 grammes après une submersion préalable de 48 heures à 30°; des poumons de bœuf encore tièdes : 5 kilogrammes.

Les pois et les plantules ont été broyés entre deux cylindres de granit que l'on pouvait serrer à volonté; on les a ensuite broyés dans des grands mortiers avec du sable fin de Fontainebleau, puis additionnés de poudre de tripoli, de façon à obtenir une pâte friable, qui se laisse épuiser facilement par la presse hydraulique.

Les poumons étaient réduits en pulpe dans un fort hache-viande et traités ensuite comme les pois ou les plantules.

Le jus qui s'écoule de la presse est recueilli dans un ballon

1. *C. R.* Juin 1902. Les *Annales*, mai 1904.
2. J. Stoklasa, Joh. Jelink und. E. Vitek. *Beitrage, zur Chem. Phy. und. Patho.* Dritter Bd., p. 460, 1903, et Stoklasa und Czerny, *Ber. d. d. Ch. Gesell.*, t. XXXVI, 21 février 1903, p. 622-634.

entouré de glace fondante; on a pressé, suivant les indications de M. Stoklasa, jusqu'à 300 atmosphères.

Le jus est aussitôt traité par un mélange d'alcool absolu (3 p.) et d'éther sec (1 p.), ce sont les proportions indiquées par Albert[1]. On obtient ainsi un précipité volumineux qu'on jette sur un filtre et qu'on maintient sous l'éther pendant 2 à 3 minutes, de façon à entraîner complètement l'alcool; on lave une dernière fois avec de l'éther sec. Le précipité est alors essoré dans du papier buvard, puis desséché à l'air ou dans un courant d'air à 30°, ou dans le vide sulfurique. Toutes ces opérations, comme le recommandent les auteurs, ont été faites très rapidement.

La recherche de la zymase a été faite :

1° Dans le jus entier tel qu'il s'écoule de la presse;

2° Dans le précipité séché à l'air libre pendant quelques minutes; celui-ci renfermait donc encore un peu d'éther;

3° Dans les précipités séchés complètement dans un courant d'air et dans le vide.

Les auteurs ont fait usage de précipité séché dans un courant d'air à 30°.

Pour observer la production de CO^2 et l'instant précis où le dégagement commence, j'ai introduit le jus entier à 15 0/0 de glucose, ou les solutions de glucose à 15 0/0 additionné de 10 grammes d'extrait éthéro-alcoolique, dans des ballons de 150 c. c. environ munis d'un tube à dégagement soudé au col, et dont la branche descendante a de 80 à 100 centimètres de longueur; la branche ascendante porte un tube latéral qui permet d'introduire le liquide à étudier et de faire immédiatement le vide à la trompe. Le ballon scellé à la flamme est ouvert sous le mercure, qui monte dans les tubes à dégagement à une hauteur que l'on note.

Dans ces conditions, voici ce que j'ai observé :

1° Le dégagement de gaz commence au bout de 12-16 heures à 30°; de 10-12 heures à 38°;

2° Les premières portions de gaz recueilli sous le mercure renferment toujours de l'hydrogène de 50 à 60 0/0 en volume; le reste étant du CO^2 ;

3° Le toluène à 1 0/0 et le sublimé à 0,01 0/0 retardent le dégagement gazeux, si on la compare au thymol 0,4 0/0. Le

1. *Berichte d. d. Chem. Gesell*, t. XXXIII, 1900, p. 3775.

thymol est donc le plus faible des trois antiseptiques employés par les auteurs, bien que le toluène et le sublimé soient également très médiocres dans les conditions indiquées;

4° Le jus entier de poumon fermente beaucoup moins activement que les extraits éthéro-alcooliques; il faut attribuer ce résultat à la présence de substances antiseptiques que le jus normal emprunte aux cellules. Le fait est général; je l'ai observé non seulement avec les sucs animaux mais avec ceux de la levure, de l'eurotiopsis, des pois, des plantules de maïs, de ricin, de pois, etc... ;

5° Les liqueurs qui ont fermenté très activement renferment de l'alcool, de l'acide lactique et de l'acide acétique.

En résumé, on trouve tous les éléments des fermentations microbiennes.

J'ai isolé ces microbes avec le concours de M. Perrier; nous en donnons les caractères et les propriétés dans une p. — note.

M. Stoklasa et ses collaborateurs ont négligé de déterminer la nature des gaz fournis par les fermentations et de préciser l'instant exact où le dégagement commence.

Ce sont justement les seuls facteurs qui leur auraient démontré que les fermentations observées ne sont ni immédiates, ni tumultueuses dès le début; elles doivent être rattachées exclusivement à une origine microbienne.

Voilà ce que j'avais obtenu dès le mois de juin 1903. Depuis, les auteurs ont publié bien d'autres résultats et précisé enfin, en la variant, leur méthode de recherches.

Leurs affirmations sont devenues moins absolues. L'intervention des microbes a été envisagée et écartée à tort, puisqu'ils n'ont pas recherché l'hydrogène dans les gaz des fermentations; ils ajoutent même qu'ils ont démontré l'existence de la diastase lactique dans les végétaux et les tissus animaux; ils auraient dû étendre leur conclusion à la diatase acétiqne.

J'ai répété mes essais en me conformant ponctuellement aux dernières indications des auteurs et en opérant encore sur des poumons de bœuf, parce que c'est l'organe qui semble, d'après leurs résultats, renfermer le plus de zymase. J'ai séparé les sucs qui s'écoulaient jusqu'à 250 at. et à partir de 250 at. jusqu'à 400, pour les traiter ensuite séparément.

Ces essais m'ont fourni exactement les mêmes résultats que

les premiers. La conclusion qui en découle est donc la suivante : les cellules végétales et animales renferment de la zymase puisqu'elles produisent de l'alcool; mais les méthodes d'isolement employées jusqu'ici ne permettent pas de l'extraire[1].

1. Voir plus loin.

Sur le rôle des microbes dans la fermentation alcoolique que M. Stoklasa attribue à la zymase isolée des tissus végétaux ou animaux.

Par P. MAZÉ et A. PERRIER.

L'un de nous a montré, dans la note précédente, que les extraits de végétaux frais ou fermentés, de tissus animaux frais, additionnés de 15 0/0 de glucose, fermentent au bout de quelques heures à 30°, sous l'influence des microbes ; le dégagement de CO^2 et la production d'alcool doivent être attribués au développement de microorganismes et non, comme l'affirment M. Stoklasa et ses collaborateurs, à la présence d'une zymase fournie par les cellules végétales ou animales.

Ces derniers ont constaté aussi la présence de bactéries dans les solutions à la fin de leurs expériences ; mais les espèces qu'ils y ont rencontrées (*B. coli commune*, *B. subtilis*, *B. fluorescens*) ne donnent pas d'alcool.

Les milieux obtenus en additionnant 100 c. c. d'une solution de glucose à 15 0/0, de 10 grammes d'extrait de tissus végétaux ou animaux, sont cependant très favorables au développement des microbes producteurs d'alcool et des ferments lactiques et, en réalité, ce sont eux qui s'y implantent ; nous avons toujours constaté qu'ils y prédominent.

Nous en avons isolé 4 espèces, *a*, *b*, *c*, *d*, différentes par leur aspect microscopique, leur mobilité et les caractères que présentent leurs cultures sur divers milieux ; elles font fermenter les solutions de glucose à 15 0/0 en bouillons nutritifs en moins de 24 heures à 30° ; la fermentation n'est pas accompagnée de dégagement visible de gaz, mais le liquide reste toujours sursaturé de CO^2 et mousse abondamment quand on l'agite.

L'activité des cultures persiste pendant très longtemps, et, quand on met fin à l'expérience, on constate que la liqueur est très peu acide, peu riche aussi en alcool. C'est la conclusion qui découle des chiffres du tableau I.

Tableau I.

Cultures en solutions de glucose à 15 0/0 (Bouillon de haricot 100 c. c.)

Espèces cultivées.	Acidité totale en $C^2H^4O^2$ p. 1,000.	Alcool pour 100 en volume.	Sucre disparu. Grammes.	Durée des cultures
a	0,888	0,200	3,733	12 jours.
b	0,806	0,180	3.333	12 —
c	0,555	0,250	4,049	12 —
d	1,110	0,213	3,733	12 —

On voit que l'alcool et les acides ne représentent pas le 1/10 du sucre détruit; on constate en outre que les 4 espèces microbiennes sont assez voisines comme propriétés physiologiques.

Quelques prises de gaz faites sous le mercure ont été soumises à l'analyse; on y a constaté de l'hydrogène et du CO^2.

Ces microbes font fermenter également le bouillon de viande additionné de glucose.

L'espèce *b* a été cultivée dans ce milieu en présence de différents sucres. Les résultats que nous avons obtenus sont réunis dans le tableau II.

Tableau II.

	Lactose 5 0/0	Maltose 5 0/0	Lévulose 15 0/0	Mannite 2 0/0	Glycérine 5 0/0	Amidon 2 0/0
Acidité totale en $C^2H^4O^2$	3,845 p. 1000	1,825	0,531	2,676	1,825	0,747
— volat. —	3,329	»	»	»	»	»
Alcool p. 100	0,103	0,147	0,250	0,5	0,487	0,07
Sucre restant p. 100	3,421	0,93	1,09	»	»	»
Durée des cultures	28 jours	28 j.	42 j.	28 j.	28 j.	28 j.

La glycérine et la mannite fournissent comme on le voit la plus grande proportion d'alcool ; on n'a pas constaté la présence de sucres réducteurs dans les milieux additionnés de glycérine ou de mannite.

L'amidon fermente également en donnant une petite quantité d'alcool.

En 6 semaines, le microbe détruit 14 grammes de lévulose sur 15, et on ne trouve comme résidu qu'un peu d'alcool et des traces d'acides ; le lévulose a été entièrement brûlé.

La puissance comburante du bacille *b* se manifeste encore en l'absence d'oxygène, car il est anaérobie facultatif, comme les trois autres, d'ailleurs.

Une expérience réalisée en vase clos, dans un ballon de 3 litres avec 100 c. c. de bouillon de haricot renfermant 2gr,266 de glucose, nous a donné les résultats suivants au bout de 48 heures à 30° :

CO^2 dégagé en poids	1gr,301
— en volume	660,2 c. c.
H dégagé en poids	0gr,0292
— en volume	330,2 c. c.
Acidité totale en $C^2H^4O^2$	0gr,091
Alcool	0gr,813
Acidité volatile en $C^2H^4O^2$	0gr,083
Poids de microbes	0gr,1231

La proportion d'alcool est plus élevée en vie anaérobie qu'en vie aérobie ; mais une fraction sensible du sucre a disparu par combustion totale ; l'eau a été décomposée ; l'oxygène a servi à oxyder le sucre ou plus exactement l'alcool qui manque ; l'hydrogène a été mis en liberté ; les acides fixes manquent ; les acides volatils sont constitués par de l'acide acétique et une faible proportion d'acide formique.

Un fait à rapprocher des résultats de M. Stoklasa, c'est la disproportion qui existe entre l'alcool réduit et le CO^2 dégagé ; la même anomalie se retrouve dans les chiffres de la communication que l'auteur a faite au congrès de Chimie appliquée de Berlin (juin 1903), ceux qui se rapportent du moins à l'action des extraits de tissus animaux.

La raison de cette anomalie est facile à donner dans nos expériences ; il n'est pas douteux que les chiffres de Stoklasa doivent s'interpréter de la même façon.

En résumé, l'étude bactériologique vient confirmer, à son tour, les conclusions formulées dans la note précédente les résultats obtenus par M. Stoklasa et ses collaborateurs sont exacts, si on ne considère que la nature des fermentations qui se déclarent dans les solutions de glucose additionnées d'extraits végétaux ou animaux ; mais l'origine des diastases qui y interviennent est tout autre que celle qu'ils indiquent.

SUR LA FERMENTATION MANNITIQUE

Par MM. U. GAYON et E. DUBOURG.

Dans un important mémoire publié dans ces *Annales* en septembre 1903, MM. P. Mazé et A. Perrier ont étudié la production de la mannite par un microbe issu d'un vin malade et par le ferment que nous avons nous-mêmes isolé en 1894. Leurs résultats, sensiblement identiques pour les deux ferments, diffèrent en plusieurs points de ceux que nous avons obtenus [1]. C'est ainsi qu'en aucun cas ils ne trouvent de glycérine ni d'acide succinique et que, par contre, ils observent de l'alcool dans les fermentations du lévulose en bouillon de haricots.

Avant d'appeler l'attention sur ces divergences, nous avons tenu à répéter nos expériences avec notre ferment, en variant les milieux de culture et en nous plaçant, en particulier, dans les mêmes conditions que MM. P. Mazé et A. Perrier.

Nous n'avons rien à changer aux conclusions de nos travaux précédents. Comme dans nos premiers essais, nous obtenons toujours de l'acide succinique et de la glycérine, et en proportions plus grandes avec le glucose qu'avec le lévulose. La production de glycérine vient d'ailleurs d'être confirmée par M. Laborde [2], non seulement avec notre ferment, mais encore avec des microbes extraits de vins malades, dans lesquels il a, le premier, reconnu le pouvoir de faire de la mannite avec le lévulose.

Il n'est donc pas permis de négliger l'acide succinique et la glycérine dans le bilan des transformations du glucose et du lévulose produites par le ferment mannitique. Et, comme les matières dosées par MM. P. Mazé et A. Perrier représentent déjà plus de 100 0/0 des sucres employés, il faut bien admettre que quelques-uns au moins de leurs chiffres sont trop élevés et que certaines de leurs méthodes d'analyse ne comportent pas une précision suffisante.

Pour établir l'équation de la réaction, et spécialement pour rechercher et doser l'acide succinique et la glycérine, il est utile que tout le sucre ait disparu de la culture; or, il n'en est pas ainsi dans le mémoire dont il s'agit. On peut déduire en effet de l'une des expériences faites avec notre ferment :

1. *Annales de l'Institut Pasteur;* juillet 1901.
2. *C. R.* 25 janvier 1904.

	Glucose.	Lactose.
Sucre total employé	36gr,000	30gr,000
Sucre disparu	13, 110	24. 379
Sucre restant	22, 890	5, 621

Le volume de chaque liquide de culture étant de 1,200 c. c, c'est donc environ 19 grammes de glucose et 4gr,7 de lévulose par litre que le ferment n'avait pas touchés. On comprend que, dans ces conditions, il ait été difficile d'extraire la glycérine et l'acide succinique par les procédés habituels.

En ce qui concerne la formation d'alcool aux dépens du lévulose, MM. P. Mazé et A. Perrier ne paraissent pas l'avoir cherchée avec le bouillon Liebig ni avec l'eau de levure où ni M. Laborde ni nous n'en avons trouvé; mais, avec le bouillon de haricots, ils en ont obtenu 0gr, 527, soit 0cc,75 pour 1,200 c. c. de liquide, ce qui représente environ 0cc, 6 par litre ou 6/10,000. A ce degré de dilution, il est bien possible de caractériser l'alcool, mais non de le doser avec exactitude, surtout si l'on tient compte, comme il est nécessaire, des causes d'erreurs résultant de la nature spéciale des bouillons et des impuretés du lévulose employé.

La présence accidentelle d'aldoses ou de saccharoses, producteurs normaux d'alcool, oblige en effet à faire des corrections incertaines, souvent de même ordre de grandeur que les nombres trouvés.

En fait, avec du lévulose parfaitement pur et avec du bouillon de haricots, exempt de sucre réducteur, nous n'avons pas obtenu d'alcool.

Dès lors, si l'alcool est absent, il n'y a pas lieu de le faire intervenir pour expliquer la formation de la mannite en face du lévulose; et la théorie basée sur l'oxydation de cet alcool par les ferments anaérobies, assurément très ingénieuse, ne se trouve pas ici justifiée. Il est d'ailleurs difficile d'admettre que le même ferment soit capable d'oxyder l'alcool en présence du lévulose et non en présence du glucose, et de faire de l'acide acétique par deux processus différents dans le premier cas et par simple dédoublement diastasique dans le second.

Quant au microbe qu'ils ont puisé dans un vin tourné, les auteurs n'établissent pas qu'il soit réellement un ferment de la tourne, puisqu'ils ne l'ont cultivé ni dans un vin sain ni dans des solutions d'acide tartrique libre ou combiné.

SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES
DES DIFFÉRENTS VENINS DE SERPENTS

PAR LE Dr F. NOC
Médecin aide-major de 1re classe des troupes coloniales.

Travail du laboratoire de M. Calmette.

Les nombreux et importants travaux qui ont été publiés au cours de ces dernières années sur les venins ne sont pas encore parvenus à élucider d'une façon précise le mécanisme de l'action de ces substances toxiques sur les différents tissus ou humeurs de l'organisme. La complexité de leur constitution, suivant l'espèce du serpent qui les fournit, d'une part, et, d'autre part, les effets variés qu'ils produisent sur le sang, sur les endothéliums vasculaires ou sur les éléments nerveux, en rendent l'étude extrêmement difficile.

Il ne faut donc pas s'étonner de rencontrer, dans les publications dont ils ont été l'objet, des interprétations contradictoires de faits pourtant bien observés : c'est ainsi que, d'après certains expérimentateurs, les venins coagulent le sang *in vitro* et *in vivo*, tandis que d'autres ont trouvé qu'ils empêchent la coagulation.

Des contradictions analogues peuvent être signalées dans les divers travaux sur les propriétés hémolytique ou protéolytique.

J'ai donc pensé faire œuvre utile, en reprenant, sous la direction de M. Calmette, avec diverses espèces de venins, l'étude comparée de leurs fonctions hémolytiques, protéolytiques, coagulantes ou anticoagulantes et neurotoxiques, en vue de préciser davantage leurs caractères physiologiques différentiels.

I

POUVOIR HÉMOLYTIQUE COMPARÉ DES VENINS DES SERPENTS.

Le pouvoir hémolytique constitue une des propriétés physiologiques les plus importantes des venins. Constaté *in vivo* depuis

longtemps, il a fait l'objet, tout récemment, de plusieurs travaux qui ont déterminé le mode d'action *in vitro* des hémolysines du venin sur les globules rouges de diverses espèces animales [1].

Les recherches de Kyes, effectuées dans le laboratoire du professeur Ehrlich, ont surtout contribué à élucider le *mécanisme intime de l'action hémolytique* [2]. Celles que j'ai entreprises ont eu pour principal but de préciser les modalités de cette action avec les diverses espèces de venins.

Dans cet ordre d'idées, MM. Flexner et H. Noguchi, expérimentant avec les venins de Cobra, de Mocassin, de Copper-head, et de Serpent à sonnettes, ont déjà publié un certain nombre de faits importants [3].

Ces savants ont pris comme unité hémolytique vis-à-vis de différents érythrocytes (M. H. D.) la dose minima de venin nécessaire pour produire une trace d'hémolyse en 24 heures sur 1 c.c. de sang défibriné dilué à 5 0/0.

Cette méthode, conforme aux principes de la théorie chimique de l'hémolyse d'Ehrlich et Morgenroth, n'est pas avantageuse pour comparer avec exactitude les divers venins : en effet, la dose minima active est souvent difficile à apprécier vis-à-vis de globules dont la résistance est variable chez la même espèce animale; et, d'autre part, la longue durée de l'expérience est susceptible d'amener des modifications importantes dans les milieux en présence, en raison des autres propriétés (digestive, agglutinante, etc.) des venins étudiés.

Dans mes expériences, j'ai employé une dilution de 5 parties de globules de cheval (lavés et centrifugés plusieurs fois) dans 95 parties d'eau salée physiologique à 9 0/00. A cet état de dilution, ces globules ne s'hémolysent jamais sous la seule influence du venin. Pour que l'hémolyse apparaisse, il est

1. W. Stephens, On the hemolytic action of snake toxins and toxic sera. (*Journ. of. path. and bact.* 1899-1900).

Flexner et H. Noguchi, Snake venom in relations to hemolysin and toxicity. (*Journ. of. experim. med.* 17 th March 1902).

Calmette, Sur l'action hémolytique du V. de Cobra (*C. R. Ac. des Sc.* 1902).

P. Kyes, Ueber die Wirkungsweise des Cobragiftes (*Berlin. Klin. Wochens.* 1902, n°s 38-39).

2. P. Kyes, Zur Kenntniss der Cobragift activirenden Substanzen (*Berlin. Klin. Wochens.* 1903, n° 2-4; — Ueber die Isolirung von Schlangengift-Lecithiden (*Berlin. Klin. Wochens.* 1903, n°s 42 und 43).

3. Flexner et H. Noguchi, The constitution of snake venom and snake sera *Univ. of Pensylv. medic. Bull.* nov. 1902.

nécessaire de restituer à 1 c. c. de la dilution, 0 c. c. 2 de sérum de cheval. Je me suis servi de sérum normal chauffé à 58°, afin de me placer dans des conditions toujours aussi identiques que possible (absence d'alexine [1]).

Les différents venins de serpents sont tous hémolytiques, mais à des doses très variables. En vue de l'étude comparative que je désirais poursuivre, j'ai pris comme base, pour chaque venin, la dose unitaire de 1 milligramme (0 c. c. 1 d'une solution à 1 0/0 fraîchement préparée et non filtrée, car la filtration sur porcelaine diminue sensiblement le pouvoir hémolytique) et je notais le temps strictement nécessaire pour que 1 milligramme de venin hémolysât complètement (solution uniformément limpide) 1 c. c. de globules lavés et dilués à 5 0/0 [2].

Les venins que j'ai expérimentés provenaient des espèces suivantes d'Ophidiens, déterminées d'après la classification du « catalogue of Snakes » de Boulenger (*British Museum* de Londres).

- **Colubridés.**
  - Cobra (*Naja tripudians*), Inde.
  - Naja noir (*Naja nigricollis*), serpent cracheur de Guinée.
  - Bungare (*Bungarus cœruleus*), Inde.
  - *Hoplocephalus variegatus* (*H. bungaroïdes*), Australie.
- **Vipéridés.**
  - Vipérinés..
    - Vipère de France (*Pelias berus, Vipera berus*).
    - Daboia (*Vipera Russellii*), Inde.
  - Crotalinés.
    - Mocassin (*Ancistrodon piscivorus*), Amérique du Nord.
    - Copper-head [1] (*Ancistrodon contortrix*), Amérique du Nord.
    - *Lachesis*
      - *Trimeresurus Riukinanus* (*L. flavoviridis*), du Japon.
      - Jararacussu (*L. lanceolatus*), Brésil.
      - Jararaca (*L. lanceolatus*), Brésil.
      - Urutu (*L. Neuwiedii*), Brésil.
      - Bothrops (*L. lanceolatus*), Martinique.

1. *Trigonocephalus contortrix* de certains auteurs.

Voici les résultats fournis par plusieurs séries d'expériences :

Avec 1 c. c. de globules de sang de cheval lavés et dilués à

1. Certains sérums non chauffés, comme l'a montré M. Calmette, favorisent moins l'hémolyse que les sérums chauffés. (*C. R. Acad. des Sc.* 1902.)

2. En lisant les divers travaux sur les hémolysines en général et l'hémolyse par les venins en particulier, j'ai été frappé de ce fait que les expérimentateurs emploient des doses très variables de substance hémolysante et des produits hémolysables préparés de manière différente, les uns se servant du sang défibriné de divers animaux, d'autres de dilutions globulaires à différents titres. J'ai pensé qu'il était préférable d'utiliser toujours les mêmes doses de venin, en faisant agir sur des globules bien lavés et débarrassés de toutes traces de sérum les substances capables d'activer le venin.

5 0/0, en présence de 0,2 de sérum de cheval normal chauffé à 58°,

1 milligr.	de venin	de Cobra	donnait une	hémolyse complète en	5 min.
—	—	Bungare	—	—	10 —
—	—	Naja noir	—	—	20 —
—	—	*Hoplocephalus*	—	—	10 —
—	—	*Vipera berus*	—	—	60 —
—	—	Daboia	—	—	30 —
—	—	*Trimeresurus*	—	—	35 —
—	—	Mocassin	—	—	40 —
—	—	Copper-head	—	—	60 —
—	—	Jararacussu	—	—	2 h.
—	—	Jararaca	—	—	2 h. 1/2
—	—	Urutu	—	—	3 h.
—	—	Bothrops	—	—	3 h.

J'ai trouvé préférable de me servir pour ces expériences de globules provenant du même cheval. Ces globules se conservent quelques jours à la glacière : les variations de la température influent sur la rapidité de l'hémolyse. Toutefois, avec des globules bien lavés, les limites dans lesquelles varie l'action hémolysante sont peu prononcées pour les venins d'un même groupe.

On voit, par le tableau précédent, que le pouvoir hémolytique est le plus intense chez les venins de la famille des Colubridés (Protéroglyphes). L'hémolyse devient moins rapide à mesure qu'on se rapproche des Crotalinés. Elle est très lente avec les venins du genreLachesis. Le venin du Trimeresurus Riukinanus, classé parmi les Lachesis, renferme toutefois une hémolysine assez active.

On peut supposer, conformément à la théorie d'Ehrlich, que la molécule hémolysante du venin de Cobra, par exemple, a de nombreux groupes haptophores, capables de se combiner aux récepteurs du globule rouge, ce qui expliquerait la grande puissance hémolytique de ce venin. Le venin de Bothrops, au contraire, posséderait des groupes haptophores beaucoup moins nombreux.

On constate, d'autre part, que le sérum normal chauffé à 58° et ajouté aux globules rouges joue un rôle capital dans l'hémolyse par les venins. En augmentant la dose de sérum dans de notables proportions, on accroît sensiblement le pouvoir hémolytique des venins faibles : l'action dissolvante du venin de Bothrops, par exemple, peut, grâce à cette addition de sérum, se manifester en quelques minutes, alors que de fortes doses de sérum seul laissent intacts les érythrocytes.

Dans ses publications récentes, P. Kyes a montré quel est le principe actif dans l'hémolyse par les venins[1]. Ce principe est la *lécithine* qui jouerait le rôle de complément, d'après la théorie d'Ehrlich. On peut même obtenir une combinaison de venin et de lécithine, la *lécithide*, qui, isolément, est capable d'hémolyser toutes les espèces de globules rouges. La nature de cette dernière substance n'est pas encore complètement élucidée; mais il paraît bien établi que la substance hémolytique du venin se combine avec la lécithine des sérums suivant des proportions variables et qu'il s'agit bien là d'une véritable combinaison chimique. Celle-ci agit-elle en mettant en liberté de la névrine ou de l'acide distéaryl-phosphoglycérique qui amènerait la dissolution des globules? Ou bien ne fait-elle que de déplacer la lécithine du globule rouge? Ce sont là des questions auxquelles l'état actuel de nos connaissances ne nous permet pas de répondre. Il est cependant à noter que cette nouvelle substance, la lécithide, est plus résistante à la chaleur que chacun de ses composants, puisqu'on peut la chauffer plusieurs heures à 100° sans que son pouvoir hémolytique soit même atténué, tandis que le venin de Cobra et les lécithines ne supportent pas une ébullition prolongée (Kyes)[2].

Il semble, d'autre part, que les hémolysines des divers venins sont de nature très voisine. Kyes a pu obtenir des lécithides très actives avec les venins de différentes espèces, et j'ai pu moi-même constater qu'en augmentant la quantité de lécithine dans les expériences *in vitro*, on peut égaliser l'intensité d'action des venins.

Les différences que montre le pouvoir hémolytique de divers groupes de venins sont cependant très grandes. Le venin de Cobra et celui de Bungare par exemple ont une action dissolvante rapide pendant laquelle les cellules n'ont pas le temps de s'agglutiner. Avec les venins des Crotalinés et des Vipérinés, il existe une période d'agglutination qui accompagne l'hémolyse partielle des globules. Il semble se produire un temps d'arrêt

1. *Loc. citato*.
2. La résistance de diverses espèces de globules résulte peut-être de ce que la constitution chimique de l'hémoglobine est variable suivant les espèces animales. On sait que les cristaux d'oxyhémoglobine sont de forme variée : on peut penser qu'il existe un rapport entre cette cristallisation, indice d'une constitution différente, et la résistance à l'hémolyse.

dans la dissolution, après lequel le laquage du sang devient parfait.

Le venin de Bothrops lanceolatus produit une précipitation rapide des globules au fond du tube : l'hémolyse apparaît ensuite et n'intéresse tout d'abord qu'une partie des hématies. Puis, lentement, les érythrocytes agglutinés finissent par s'hémolyser et la dissolution s'achève en 3 heures. Il semble que l'hémolysine, n'existant ici qu'en faible quantité au début de l'expérience, épuise son action sur la deuxième moitié de globules, de même que l'on épuise la force hémolytique d'un sérum par l'addition de doses fractionnées de globules rouges.

Cette différenciation des hémolysines montre en somme qu'en étudiant l'action hémolysante d'un venin vis-à-vis d'une espèce de globules à résistance moyenne comme ceux du cheval, il est posible de déterminer avec assez de précision à quel groupe de la classification zoologique se rattache le reptile qui a produit ce venin.

On peut arriver, d'autre part, à obtenir avec certains venins des sérums antihémolytiques à doses variables contre la plupart des espèces de venins de serpents, ce qui tendrait à démontrer, avec les considérations précédentes, que l'activité de ces sécrétions est due à la présence, sinon d'une substance hémolysante unique, du moins de substances de nature similaire dont un sérum antihémolytique, spécifique pour une sorte de venin déterminée, peut mesurer le degré de similitude.

Immunisons par exemple un animal contre un venin d'espèce A La dose antihémolytique du sérum de cet animal étant connue à l'égard du venin A, nous pouvons rechercher si cette dose est active contre la dose unitaire (1^{mgr}) des venins B, C, etc. Nous pourrons voir alors que ces venins B, C... exigent pour neutraliser leur hémolysine d'autant plus de sérum actif que celle-ci s'éloigne de l'hémolysine A par ses caractères.

Avec le sérum d'un animal immunisé contre le venin de *Cobra* et contre celui de *Bothrops lancœolatus*, il m'a fallu les doses suivantes pour neutraliser la dose unitaire (1^{mgr}) de divers venins en présence de 1 c. c. de globules lavés, dilués à 5 0/0, et de $0^{cc},2$ de sérum normal chauffé à 58°.

SÉRUM antivenimeux.	VENINS	HÉMOLYSE
0 c.c. 5	V. Cobra.	0
0 c.c. 5	V. Bothrops.	0
0 c.c. 5	V. Urutu.	0
0 c.c. 5	V. Bungare.	0
0 c.c. 6	V. Jararaca.	0
0 c.c. 6	V. Naja noir.	0
0 c.c. 7	V. Vipère.	0
1 c.c	V. *Trimeresurus.*	Hémolyse.

On sait que le pouvoir antitoxique d'un sérum antivenimeux est surtout en rapport avec son action antineurotoxique. Cependant, l'expérience montre que les deux pouvoirs antineurotoxique et antihémolytique se superposent ordinairement et qu'un sérum très antitoxique vis-à-vis d'une espèce venimeuse empêche le plus souvent l'hémolyse par les autres venins. On peut donc déduire des données précédentes qu'un sérum antihémolytique et antitoxique contre le venin de Cobra est aussi antihémolytique et antitoxique contre les venins de Naja Noir, de Bungare, et contre d'autres venins du même groupe de Colubridés, ou même contre certains venins de Vipéridés, bien qu'il n'ait été élaboré qu'avec l'aide du venin de Cobra seul. L'échelle d'antitoxité de ce sérum vis-à-vis de ces divers venins peut être dressée d'après les doses nécessaires pour neutraliser leur action hémolytique, comme l'ont déjà montré M. Stephens et M. Calmette.

En résumé, de l'étude comparée du pouvoir hémolytique chez les différents venins de serpents, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° La différenciation des hémolysines permet de classer les venins en plusieurs groupes qui se rapprochent des groupes déterminés par les naturalistes dans la classification des espèces venimeuses ;

2° Cette étude des propriétés hémolytiques des venins montre que les mêmes lois ont présidé à la différenciation mor-

phologique des espèces venimeuses et à la différenciation fonctionnelle de leurs glandes à venin. Elle permet de compléter ou de confirmer les bases de la classification naturelle ;

3° L'échelle d'activité antitoxique d'un sérum antivenimeux vis-à-vis de plusieurs venins peut être dressée par la mesure *in vitro* de son pouvoir antihémolytique (en tenant compte, bien entendu, des propriétés spéciales à chaque espèce de venin et de la résistance propre à chaque espèce animale).

II

POUVOIR COAGULANT DES VENINS DE SERPENTS

Lorsqu'on fait l'autopsie des animaux qui succombent à l'inoculation de divers venins ou d'un même venin à doses variables, on trouve le sang tantôt coagulé en masse, tantôt dissous.

Weir Mitchell[1] expliquait ces différences par l'hypothèse que dans le cas de mort rapide, le sang n'avait pas le temps d'être modifié par le venin et la coagulation ne se produisait pas, tandis que, si la mort survenait plusieurs heures après la morsure, le venin agissait sur les éléments du sang et coagulait ce liquide.

Les travaux ultérieurs de J. Fayrer, de Halford, de C.-J. Martin, de Lamb, montrent que cette hypothèse n'est pas justifiée et que certains venins produisant presque toujours la coagulation du sang *in vivo* et *in vitro*, d'autres, au contraire, ne la produisent jamais.

En serrant de plus près l'étude de cette question, j'ai constaté que les venins de Colubridés — du moins ceux que j'ai pu expérimenter — *Naja Tripudians, Naja Nigricollis, Bungarus cæruleus*, ne coagulent jamais le sang *in vitro*, ni les plasmas chlorurés, oxalatés, citratés, fluorés, ni le sang rendu incoagulable par l'extrait de sangsue.

Au contraire, les venins de Vipéridés sont presque tous plus ou moins coagulants et j'ai pu les ranger d'après l'intensité de leur action coagulante sur les divers plasmas, dans l'ordre suivant :

1. *Smithsonian Institution* (1860-1861) et *Experimental contrib. to the toxical of Rattlesnake Venom.* (New-York, 1868).

CROTALINÉS : *Lachesis lanceolatus* (Bothrops), Martinique.
Lachesis urutu (*Neuwiedii*), Brésil.
Lachesis jararaca, Brésil.
Lachesis jararacussu, Brésil.
Lachesis flavoviridis ou *Trimeresurus Riukinanus*, Japon.
VIPÉRINÉS : *Vipera Russellii* (Daboia), Birmanie.

J'ai trouvé tout à fait inactifs deux venins de Crotalinés de l'Amérique du Nord : *Ancistrodon contortrix* et *Ancistrodon piscivorus.*

Il y a donc une différenciation très nette entre les divers venins au point de vue de leur pouvoir coagulant : cette différenciation paraît être en raison inverse de celle que présente leur pouvoir hémolytique.

J'ai étudié spécialement l'action *in vitro* du venin du *Lachesis lanceolatus* de la Martinique sur les divers plasmas citratés, chlorurés, oxalatés, fluorés et sur le sang rendu incoagulable par l'extrait de têtes de sangsues.

Voici les résultats de mes expériences :

DOSES de venin de *Lachesis lanceolatus*.	+ 1 C. C. DE PLASMA DE LAPIN OU DE CHEVAL				
	Citraté.	Chloruré.	Oxalaté.	Fluoré.	A la sangsue.
1 mgr.....	Coagulation en 5′.	Coagulation en 10′.	Coagulation en 10′.	Coagulation en 5′.	Coagulation en 5′.
2 mgr.....	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
3 mgr.....	Coagulum diffluent.	Coagulum diffluent.	Coagulum diffluent.	Coagulum diffluent.	Coagulum diffluent.
4 mgr.....	Pas de coagulation.	Pas de coagulation.	Pas de coagulation.	Pas de coagulation.	Pas de coagulation.
5 mgr.....	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
10 mgr.....	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.

Donc les doses faibles de venin de Lachesis coagulent rapidement les divers plasmas[1], tandis que les doses supérieures à 3 milligrammes ne coagulent plus.

J'ai observé d'autre part que le même venin chauffé perd ses propriétés coagulantes. Celles-ci s'affaiblissent déjà à partir

1. Plasma citraté à 1 p. 100; pl. oxalaté à 2 p. 1000; pl. chloruré au NaCl à 4 p. 100; pl. fluoré à 3 p. 1000 : 1 c. c. de ces plasmas coagule en 15 à 20 minutes par addition de $0^{cc},4$ à $0^{cc},6$ d'une solution de $CaCl^2$ à 0,50 p. 100.

de 58° et disparaissent entièrement après une demi-heure de chauffage à 80° en tube scellé.

Mécanisme de l'action coagulante du venin. — On sait que dans les plasmas citratés, chlorurés, oxalatés, la plasmase (ou fibrinferment) se trouve inactivée et que celle-ci réapparaît lorsqu'on ajoute au plasma des doses suffisantes de chlorure de calcium. Or, le venin, produisant une coagulation plus rapide de ces plasmas que l'addition de chlorure de calcium, on peut en conclure qu'il agit en activant la mise en liberté de la plasmase.

Nos connaissances sur la nature de la plasmase étant encore à l'heure actuelle fort limitées, il est difficile toutefois d'affirmer si le venin agit simplement par activation de la plasmase à la façon des extraits d'organes, ou comme une véritable plasmase.

La substance coagulante de ces venins est précipitable par l'alcool. Le précipité redissous a les mêmes propriétés que la solution de venin originelle.

Les globules rouges ne jouent aucun rôle dans la coagulation par le venin : si l'on sépare ces globules par centrifugation du plasma, le venin coagule le plasma déglobulisé dans le même temps et avec la même intensité que le sang total. D'ailleurs l'action destructive du venin sur les hématies ne peut intervenir dans la coagulation : celle-ci est un phénomène presque instantané, tandis que l'hémolyse nécessite avec le venin de Lachesis lanceolatus plusieurs heures de contact.

L'examen microscopique du mélange de sang et de venin ne décèle d'ailleurs aucune altération ni des globules rouges, ni des leucocytes.

Le sérum antivenimeux n'empêche nullement l'action coagulante des venins. Il est facile d'expliquer ce fait, puisque les venins qui servent à l'élaboration du sérum ont été chauffés à 70, température à laquelle est fort atténué leur pouvoir coagulant.

Il est possible toutefois de préparer des sérums actifs contre la substance coagulante des venins en se servant de venins non chauffés injectés à petites doses fréquemment répétées; de tels sérums pourraient rendre des services dans les contrées où abondent presque uniquement les serpents à venin coagulant.

En résumé, les divers venins de serpents se différencient

nettement d'après l'intensité de leur pouvoir coagulant sur le sang.

Il est possible d'utiliser cette différenciation pour une classification rationnelle des espèces venimeuses. Les venins coagulants paraissent agir en activant le fibrin-ferment ou en provoquant sa mise en liberté dans le sang.

La différenciation des venins au point de vue de leur pouvoir coagulant permettra d'expliquer plusieurs des divergences qui séparent les observations des physiologistes sur les effets du venin sur la coagulation *in vivo*.

III

PROTÉOLYSE PAR LES VENINS

Si la propriété coagulante est l'apanage de quelques espèces de venins, les phénomènes de protéolyse s'observent, comme le processus hémolytique, à un degré variable avec tous les venins de serpents. Il est possible d'en faire l'étude comparative soit *in vivo*, soit *in vitro*, sur les albuminoïdes du sérum, sur la fibrine, sur les endotheliums vasculaires, sur le collagène des tissus, sur l'ovalbumine coagulée, etc.

I. Protéolyse et incoagulabilité du sang. — Parmi ces phénomènes protéolytiques, les plus importants sont ceux qui se produisent aux dépens de la fibrine dissoute (fibrinogène) et provoquent l'*incoagulabilité* du sang. De nombreux expérimentateurs ont noté qu'à la phase de coagulation du sang par les venins succédait une phase d'incoagulabilité et des divergences se sont produites depuis de longues années sur l'interprétation de ce phénomène variable lui-même suivant les venins et la tehnique expérimentale.

J'ai pu étudier *in vitro* l'incoagulabilité du sang sous l'influence de diverses espèces de venins et j'ai pu me convaincre que ce phénomène était lié intimement dans tous les cas à l'action protéolytique de ces sécrétions.

J'ai constaté tout d'abord que ni le sang au sortir des vaisseaux, ni les plasmas citratés, oxalatés, etc., lorsqu'ils ont été traités par les venins, ne sont susceptibles de se coaguler ni spontanément, ni par addition de doses de chlorure de calcium

suffisantes pour coaguler des quantités égales en tubes témoins.

L'apparition de l'incoagulabilité est plus ou moins accélérée suivant les doses de venin employées. C'est ainsi que le venin de *Lachesis lanceolatus*, qui coagule 1 c. c. de plasma citraté à la dose de 1, 2 ou 3 milligrammes, manifeste la propriété anticoagulante à partir de 4 milligrammes.

Enfin le temps de contact nécessaire pour produire l'incoagulabilité est à considérer : 1 milligramme de venin de Lachesis lanceolatus qui *coagule* 1 c. c. de plasma en 2 à 5 minutes *liquéfie* le coagulum en 10 à 12 heures s'il s'agit du sang total, en 3 heures s'il s'agit du plasma déglobulisé. Ce plasma, ainsi dissous, est incoagulable désormais, soit par dilution, soit par addition de $CaCl^2$.

En comparant les divers venins d'après ces variations, j'ai pu les ranger dans l'ordre suivant selon l'intensité de leur action anticoagulante :

CROTALINÉS
- *Ancistrodon piscivorus* (mocassin).
- *Ancistrodon contortrix* (copper-head).
- *Lachesis lanceolatus* (Brésil et Martinique).
- *Trimeresurus Riukinanus*.

VIPÉRINÉS : *Vipera Russellii* (daboia).

COLUBRIDÉS
- *Naja nigricollis* (serpent cracheur).
- *Bungarus cœruelus*.
- *Naja tripudians* (cobra).

Il est important de considérer, pour expliquer ce qui se passe chez l'animal envenimé, que les venins *coagulants* eux-mêmes, employés à dose suffisante, provoquent rapidement l'incoagulabilité du sang. J'ai vérifié ce fait non-seulement pour les venins du genre Lachesis, mais aussi pour celui d'un vipériné, le *Daboia Russellii*. Dans son étude comparative du V. de cobra et du V. de daboia, Lamb[1], ayant voulu démontrer la différenciation profonde de ces deux venins, a constaté que ce dernier est coagulant même à la dose de 5 milligrammes. Or avec la dose de 6 milligrammes, j'ai obtenu l'incoagulabilité du sang, ce qui montre bien que le V. de daboia rentre, à ce point de vue, dans la loi générale.

Voici quelles sont les doses fixes anticoagulantes que j'ai obtenues pour les principaux types de venins :

1. G. LAMB, *On the action of the venoms of the Cobra and of the Daboia on the red blood corpuscles and on the blood plasma.* Calcutta, 1903.

VENINS	DOSES	PLASMAS citratés, oxalatés, etc.	RÉSULTATS par addition, 10 minutes après, de 1 c. c. sol. $CaCl^2$ à 0,50 0 0.
		1 c. c.	Coagulation en 15 minutes.
Ancistrodon piscivorus.	1 mgr.	1 c. c.	Pas de coagulation en 24 heures.
Ancistr. contortrix....	2 mgr.	1 c. c.	— — —
Lachesis lanceolatus...	4 mgr.	1 c. c.	— — —
Vipera Russellii.......	6 mgr.	1 c. c.	— — —
Naja tripudians.......	10 mgr.	1 c. c.	— — —

Le processus protéolytique dans le phénomène de l'incoagulabilité est facile à mettre en évidence avec le venin de Lachesis, puisque celui-ci digère le plasma coagulé à la dose de 1^{mgr} : l'incoagulabilité consécutive est bien la résultante de la digestion de la fibrine précipitée.

Quant aux venins non coagulants de Colubridés et de certains Crotalinés, on peut démontrer qu'ils agissent sur la fibrine dissoute ou plutôt sur le fibrinogène du sang. En effet :

1° Les plasmas au venin diffèrent essentiellement des plasmas à la peptone, à la sangsue, etc., dans lesquels l'incoagulabilité passagère est provoquée par la neutralisation du fibrin-ferment. On sait que ces plasmas, soumis à l'action de *thrombases*[1], coagulent, soit par addition d'eau distillée, ou de sels solubles de chaux, soit spontanément après un temps variable. Le plasma à la sangsue coagule également, par addition de substances qui accélèrent la mise en liberté de fibrin-ferment, telles que les doses faibles de venin de Lachesis.

J'ai constaté par contre que les plasmas rendus incoagulables par le venin de Cobra ne sont susceptibles de se coaguler ni par addition de venin de Lachesis, ni par addition de sérum antivenimeux, de sérum normal ou de sérum physiologique, ni par addition de $CaCl^2$.

Ces plasmas sont donc profondément modifiés non dans leur principe coagulant, mais dans leur substance coagulable.

En présence de 1 c. c. de divers plasmas et de 1 milligrammes de venin de cobra :

1. Duclaux, *Traité de microbiologie*, t. II, Diastases.

VENIN de cobra.	4 HEURES après, addition de	RÉSULTATS
1 mgr.....	1 mgr. V. *Lachesis.*	Pas de coagulation en 24 heures.
—	0 c. c. 5 sérum antivenimeux.	— — —
—	0 c. c. 8 — —	— — —
—	0 c. c. 5 sérum normal.	— — —
—	0 c. c. 8 —	— — —
—	0 c. c. 8 solution physiologique.	— — —
—	0 c. c. 4 solution de $CaCl^2$.	— — —
	0 c. c. 4 — —	Coagulation en 20.'

2° Il est d'ailleurs possible d'étudier isolément l'action des venins sur les albuminoïdes dissoutes et sur la fibrine.

Launoy[1] a constaté, en expérimentant sur les substances albuminoïdes dissoutes (caséine, albuminoïdes du sérum de bœuf) que les venins de Cobra et de Vipère produisent la désintégration de la molécule albuminoïde. Il a vu, d'autre part, comme l'avait établi Delezenne[2] en ce qui concerne l'ovalbumine coagulée, que ces venins sont sans action sur les albuminoïdes coagulées (ovalbumine et albuminoïdes du sérum) et sur la fibrine.

MM. Flexner et H. Noguchi[3] ont observé l'action liquéfiante des venins de Crotale et de Cobra sur la gélatine et ont vu aussi la désintégration des fibres musculaires *in vitro* par ces venins.

II. *Action protéolytique des venins sur la fibrine et la gélatine.* — En étudiant l'action protéolytique des venins sur la fibrine isolée par battage du sang et desséchée, j'ai pu constater le parallélisme étroit de la fibrinolyse et de l'action anticoagulante.

Je résume dans le tableau ci-après les résultats que j'ai observés avec la fibrine du sang de cheval et celle du sang de lapin en milieu toluolé à 37°.

1 c. c. solution à 1 0/0 V. *Ancist. piscivorus* digère 3 cgr. fibrine en 2 heures.
1 c. c. — — V. *Ancist. contortrix* — — — 2 —
1 c. c. — — V. *Lachesis lanceol.* — — — 2 —

1. Sur l'action protéolytique des venins. *C. R. Ac. des Sc.* 1er septembre 1902 et *Thèse doct. ès sc.* Paris, 1903, n° 1138.
2. Sur l'action kinasique des venins. *C. R. Ac. des Sc.* 11 août 1902.
3. The constitution of snake venom and nake sera (*Univ. of. Pensylv.* 1902).

1 c. c. solution à 1 0/0	V. *Trimeresurus R.*	digère 3 cgr. fibrine en 3 heures.	
1 c. c. —	— V. *Daboia Russellii*	— — — 24 —	
1 c. c. —	— V. *Naja tripudians*	attaquent légèrement la fibrine en 24 heures.	
1 c. c. —	— V. *Naja nigricollis*		
1 c. c. —	— V. *Bungarus cœruleus*		

J'ai obtenu, d'autre part, des résultats presque identiques en étudiant l'action protéolytique des venins sur la gélatine. On peut utiliser dans ce but une solution de gélatine à 20 p. 100, thymolée à 2 p. 1000. On mélange intimement à 1c. c. de cette gélatine encore liquide 1 milligramme de chaque venin (0 c. c. 1 de solution à 1/100) dans de petits tubes qu'on porte à l'étuve à 37°. Les tubes sont retirés toutes les heures et plongés dans l'eau à 15°. On note au bout de combien de temps de séjour à l'étuve les tubes restent liquéfiés avec la dose unitaire de 1 milligramme de venin[1].

Il résulte de ces recherches comparatives que les phénomènes d'incoagulabilité sont bien liés à l'action protéolytique.

J'ai constaté d'ailleurs que l'action fibrinolytique des venins et l'action anticoagulante sont complètement détruites pour les divers venins à la température de 80° après une demi-heure de chauffage au bain-marie en tubes scellés.

Il n'est donc pas nécessaire de faire intervenir dans le phénomène de l'incoagulabilité par les venins les théories émises ces dernières années par les physiologistes sur les substances anticoagulantes, notamment par C.-J. Martin (1895)[2], Delezenne (1897-1898-1899)[3], C. Phisalix (1899-1902-1903)[4]. En dehors du rôle du foie dans l'incoagulabilité, Delezenne attribue à la résistance respective des leucocytes et des hématies suivant les espèces une part importante dans les variations de la coagulabilité, tandis que Phisalix estime qu'il faut rattacher ces variations sous l'influence des venins à la présence dans le sang de certains animaux d'une antihémolysine, à celle d'une sensibilisatrice chez d'autres.

1. G. Malfitano, Protéolyse par l'*Aspergillus niger*. Ces *Annales*, 1900, p. 60.
2. C.-J. Martin, On the physiol. action of the venom of the Austral. black snake. (*Pseudechis porphyriacus*). Melbourne, 1895.
3. C. Delezenne, Action du ser. d'anguille et des extraits d'organes (*Arch. de physiologie*, 1897). Action leucolytique des agents anticoagulants du groupe de la peptone. (*Arch. de physiologie* 1898.) — Erythrolyse et actions anticoagulantes. (*Soc. biol.*, 28 oct. 1899.)
4. C. Phisalix, Venins et coagulation du sang (*Soc. biol.* 28 oct. 1899). — *Soc. biol.* 4 nov. 1899 (V. de vipère, peptone et extrait de sangsue). — Action du v. de vipère sur le sang de chien et de lapin (*Soc. biol.*, 26 juillet 1902). — Rapports des venins avec la biol. générale. (*Rev. générale des sciences pures et app.*, 30 déc. 1903.)

Je me suis rendu compte que dans les plasmas incoagulables par les venins de Cobra, de Mocassin, de Lachesis, etc., l'examen microscopique ne révèle d'altération, ni des leucocytes, ni des hématies. Certains leucocytes ont même conservé leurs mouvements amiboïdes. Les phénomènes d'hémolyse et de leucolyse n'apparaissent *in vitro* que *tardivement* ou par l'emploi de doses très fortes de venin plus que suffisantes pour produire l'incoagulabilité.

Il est sans doute difficile d'isoler la substance anticoagulante ou protéolytique des venins de la substance hémolysante. L'alcool et les sels précipitent presque toutes les substances albuminoïdes dans les solutions aqueuses : on retrouve toutes les propriétés du venin dans le précipité redissous dans l'eau physiologique. Mais il est possible de provoquer l'hémolyse de diverses espèces de globules avec des venins chauffés à 80° ayant perdu toute action coagulante ou anticoagulante.

Je me suis assuré d'ailleurs que le sérum antivenimeux n'empêche pas l'action anticoagulante des venins *in vitro*. Ce phénomène tient à ce que le sérum est préparé à l'aide de venins chauffés à 70° et ayant perdu presque entièrement leur pouvoir anticoagulant. Or ce même sérum est fortement antihémolytique, ce qui montre bien que les antihémolysines ne jouent aucun rôle dans les phénomènes de coagulation et d'incoagulabilité.

En résumé :

1° Tous les venins de serpents possèdent une action protéolytique variable sur les substances albuminoïdes non coagulées par la chaleur ;

2° Leur action fibrinolytique explique leur rôle important dans les phénomènes d'incoagulabilité du sang à la suite des injections de venin ;

3° La substance protéolytique et anticoagulante des venins est détruite par le chauffage à 80° ;

4° Les hémolysines et les antihémolysines n'ont aucune corrélation avec les phénomènes de coagulation et d'incoagulabilité ;

5° Il y aurait intérêt à préparer des sérums contre la substance protéolytique et anticoagulante des venins.

IV

NEUROTOXINES

Lorsqu'on injecte sous la peau d'animaux sensibles des doses mortelles de divers venins, on observe des phénomènes fort différents suivant les espèces venimeuses. Alors que les venins du Colubridés tuent par action neurotoxique et paralysie bulbaire[1], sans provoquer d'autres phénomènes locaux qu'un peu d'œdème au point d'inoculation, les venins de la plupart des Vipéridés produisent des désordres violents dans les tissus : hémorragies en nappe dans tous les points où a diffusé le venin, apparition plus ou moins étendue d'une eschare suivie d'une véritable digestion des tissus et des pertes de substance considérables. Les venins de Vipéridés possèdent donc une propriété qui les différencie nettement des autres venins : c'est ce que l'on appelle la propriété hémorragipare.

Il était intéressant de rechercher si ces venins possèdent au même titre que les venins de Colubridés la *neurotoxine* dont l'action est masquée par les effets des substances hémorragipares.

Les travaux de M. Calmette et de MM. Phisalix et Bertrand ont déjà bien montré que le chauffage des venins vers 80° leur fait perdre leur propriété phlogogène, tandis que le pouvoir toxique n'est détruit, pour des doses massives, qu'à une température voisine de l'ébullition. En chauffant les divers venins graduellement de 60° à 80° pendant une demi-heure en tube scellé au bain-marie, j'ai pu me rendre compte que tous les venins perdent complètement la propriété hémorragipare et ne déterminent chez la souris qu'un léger œdème pour toute réaction locale.

Il est nécessaire, dans ces essais à diverses températures, d'expérimenter tour à tour avec des doses simplement mortelles et des doses massives : on observe en effet que certains venins tels que celui de Daboia qui ne développent plus d'hémorragie à la dose de 1 milligramme, après chauffage à 70°, sont encore hémorragipares à la dose de 1 centigramme.

On peut donc arriver à débarrasser les venins de toute substance hémorragipare par le chauffage à 80°. Par centrifugation on sépare les substances coagulées et l'on obtient des

1. CALMETTE, Etude expérim. du v. de Cobra, ces *Annales*, 1892.

solutions limpides qui doivent contenir la neurotoxine, puisque celle-ci n'est détruite qu'aux environs de 100° et au delà [1].

D'après cette méthode, j'ai pu rechercher les doses de neurotoxine mortelles en 1 h. 1/2 à 2 heures *pour la souris* et j'ai obtenu les résultats suivants :

DOSES MORTELLES DE VENIN (Solutions fraîchement préparées à 1 0/0.)		DOSES MORTELLES DE NEUROTOXINE (Solut. de venin ch. à 80° et centrifugées.)	
V. Cobra	0gr,00005 et 0gr,0001	V. Cobra	0gr,0001
V. Naja noir	0gr,0004	V. Naja noir	0gr,0004
V. Bungare	0gr,0004	V. Bungare	0gr,0004
V. Daboia	0gr,0008	V. Daboia	0gr,001
V. Mocassin	0gr,001	V. Mocassin	0gr,03 à 0gr,05 [1].
V. *Trimeresurus.*	0gr,001	V. *Trimeresurus.*	Ne tuent pas à
V. *Lachesis lanc.*	0gr,005 et 0gr,006	V. *L. lanceolatus.*	0gr,05 centigr.

1. La résistance peut se prolonger au-delà de 2 heures.

Donc les venins fortement hémorragipares (Crotalinés) possèdent une neurotoxine très peu active ou sont dépourvus de neurotoxine et ne déterminent la mort des animaux que par les lésions réactionnelles qu'ils provoquent dans les tissus (coagulation, protéolyse, hémorragies).

Il est à remarquer toutefois que, dans ces expériences, la propriété neurotoxique ne résiste pas isolément, mais que les venins ont conservé pour la plupart leur propriété hémolytique. Seule l'hémolysine peu active des venins de Lachesis est détruite à 80° ; les autres sont conservées intégralement. Ce fait différencie d'une part la propriété hémorragipare, qui est indépendante des hémolysines, et montre en outre l'affinité étroite qui existe entre les neurotoxines et les hémolysines du venin, affinité déjà connue par la concordance d'action des antihémolysines et des antineurotoxines du sérum antivenimeux.

Pour compléter ces notions, j'ai recherché les doses de sérum nécessaires pour neutraliser les neurotoxines isolées à

VENINS	NEUROTOXINE	DOSE DE SÉRUM antineurotoxique pour la souris.
V. Cobra	0 gr. 0001.	0 c. c. 015 ou 0 c. c. 02.
V. Naja noir	0 gr. 0004.	0 c. c. 08 à 0 c. c 1.
V. Bungare	0 gr. 0004.	0 c. c. 1.

1. CALMETTE, Ces *Annales* 1894-1897.

80°. J'ai obtenu les résultats ci-après qui sont d'ailleurs identiques pour les venins chauffés et non chauffés.

Ce sont là les résultats les plus importants au point de vue pratique, ces venins étant éminemment toxiques et les plus répandus.

En ce qui concerne le V. de Daboia, il y a lieu d'admettre que sa neurotoxine est différente de celle du V. de Cobra, le sérum préparé contre ce dernier n'ayant pour résultat que de retarder la mort de l'animal. Il serait intéressant de préparer un sérum contre la neurotoxine de ce venin, bien qu'il soit peu répandu et agisse également par ses substances hémorragipares.

Les venins des Crotalinés enfin étant dépourvus de neurotoxine ou possédant une neurotoxine d'action extrêmement faible, il serait surtout utile de chercher à préparer des sérums efficaces contre les substances coagulante et protéolytique.

CONCLUSIONS

Sécrétions de nature complexe, les venins de serpents présentent, dans leur constitution, des substances importantes pour le physiologiste, dont les principales sont des *hémolysines*, des *coagulines*, des *protéolysines* et des *neurotoxines*.

Ces substances confèrent aux divers venins des caractères nettement différenciés qui peuvent servir à confirmer ou à compléter les bases de la classification zoologique des espèces venimeuses.

C'est ainsi que les venins de Colubridés sont des venins pourvus d'hémolysines et de neurotoxines résistantes à la chaleur. Parmi les venins de Vipéridés, la plupart des Crotalinés ont des propriétés coagulante et protéolytique énergiques, mais sont dépourvus de neurotoxine et possèdent des hémolysines peu résistantes. Les venins de Vipérinés occupent une place intermédiaire, par leurs caractères physiologiques, entre les venins des Colubridés et ceux des Crotalinés.

Les venins de serpents possèdent encore d'autres propriétés (cytolytique, leucolytique, agglutinante, amylolytique, etc.), encore peu connues.

On pourrait trouver dans l'étude de ces propriétés de nou-

veaux éléments de différenciation des venins et en retirer des conclusions importantes pour la chimie générale des sécrétions et des produits cellulaires.

Je remercie M. Calmette des conseils si bienveillants qu'il m'a prodigués pendant l'exécution de ce travail.

ACTION DU SÉRUM DE CHEVAL CHAUFFÉ

INJECTÉ DANS LE PÉRITOINE

Son utilisation en chirurgie abdominale

Par Le Dr RAYMOND PETIT

Depuis les travaux de M. Metchnikoff, on sait que l'organisme se défend contre les infections microbiennes par un mécanisme particulier, la phagocytose. — Cette découverte comportait comme déduction pratique que tous les moyens aptes à stimuler la sortie des leucocytes au niveau du foyer infecté, devaient favoriser la phagocytose et par conséquent aider à la guérison.

Dans la cavité péritonéale en particulier, certaines substances déterminent un appel leucocytaire très accusé qui peut être utilisé pour combattre l'infection de la séreuse.

Sur les conseils de M. Metchnikoff, j'ai cherché à voir dans quelle mesure cette propriété pourrait être utilisée dans les opérations abdominales en général et plus particulièrement dans celles qui sont pratiquées pour des affections septiques.

C'est dans son laboratoire à l'Institut Pasteur que nous avons pu faire les expériences dont nous allons exposer brièvement les résultats [1]

Dans mes premières expérimentations, je pratiquais la laparotomie chez un cobaye préparé par une injection intra-péritonéale d'eau physiologique faite la veille, et chez un cobaye témoin; chez les deux animaux je faisais une perforation intestinale, je laissais sortir un peu de matières fécales dans le péritoine, puis je suturais la perforation et refermais l'abdomen. Voici les résultats obtenus.

Dans une 1re expérience, le cobaye préparé est mort 41 heures après le cobaye témoin; dans une 2e expérience, le cobaye préparé est mort 24 heures plus tard que le cobaye témoin. Un second cobaye témoin a survécu après avoir fait une péritonite

1. Voir notre première communication à la Société de biologie du 28 décembre 1901, p. 1815.

localisée, mais la perforation intestinale avait porté sur une anse vide.

Les résultats de cette dernière expérience prouvaient que les infections ne pouvaient pas être exactement comparables. J'essayai alors de faire une perforation, de la suturer sans laisser sortir de matières et d'injecter dans le péritoine des quantités déterminées de matières fécales de cobaye.

Dans une 1re expérience, le cobaye préparé est mort 26 heures plus tard que le cobaye témoin.

Dans une 2me expérience, le cobaye préparé est mort 24 heures plus tard que le témoin.

De toutes ces expériences il ressort un fait, c'est que l'animal préparé par l'injection intra-péritonéale d'eau physiologique résiste plus longtemps que les témoins.

Mais il y a encore dans ces deux dernières expériences des conditions défectueuses. J'essayai de déterminer la dose minima de matière fécale de cobaye nécessaire pour tuer un animal de même espèce par injection intra-péritonéale et je me rendis vite compte que les diverses prises de matières n'avaient pas le même pouvoir infectant et qu'il était impossible de faire ainsi deux expériences comparables entre elles.

J'ai donc dû reprendre des expériences analogues à celles que Isaëff avait faites avec le bacille du choléra. Pour cela, j'ai déterminé d'abord la dose mortelle de cultures de bacilles typhiques, de *bactérium coli*, de staphylocoques, en injection intra-péritonéale chez le cobaye. Je me servais, pour chaque espèce microbienne, d'une même race en culture de 24 heures, sur gélose inclinée ; j'émulsionnais la totalité de cette culture en surface, dans 10 c. c. d'eau physiologique et j'injectais à une série de cobayes des doses progressivement croissantes de cette émulsion dans la cavité péritonéale.

Entre temps, j'ai cherché à savoir, comme Isaëff, quelle est la substance dont l'injection intra-péritonéale détermine le plus puissant appel de leucocytes polynucléaires et par conséquent stimule le mieux la phagocytose.

J'ai donc injecté comparativement dans le péritoine des cobayes de l'eau physiologique, du sérum de cheval chauffé. Toutes les 2 heures je prélevais, avec une pipette très effilée, un peu du liquide exsudé dans la cavité péritonéale et, l'examinant au

microscope, je pouvais suivre pour ainsi dire pas à pas les progrès de l'afflux leucocytaire. Le sérum de cheval nous a paru produire manifestement une leucocytose maxima. Cette leucocytose est notamment beaucoup plus abondante et plus durable que celle qui résulte déjà d'une simple laparotomie ; elle atteint son maximum au bout de 24 heures environ.

C'est donc au sérum de cheval normal que nous avons donné la préférence.

Sur le conseil de notre ami M. Besredka, nous avons fait chauffer ce sérum au bain-marie pendant 2 heures, à la température de 55° avant de l'utiliser, parce que le sérum chauffé est de ce fait même beaucoup moins toxique. Ajoutons que ces injections qui produisent un afflux leucocytaire ne déterminèrent aucun accident chez les animaux. Elles sont inoffensives.

Le liquide à injecter étant choisi et la dose mortelle d'une culture exactement déterminée, j'ai préparé un certain nombre de cobayes par une injection intra-péritonéale de sérum de cheval chauffé. Le lendemain je leur injectais dans le péritoine de une à cinq fois la dose mortelle de culture émulsionnée, tandis que des animaux témoins recevaient de la même façon une dose mortelle, sans avoir subi l'injection préparante de sérum.

Les résultats ont été très caractéristiques et constants dans toutes les séries d'expériences. Avec le bacille typhique comme avec le *bactérium coli*, les animaux préparés ont tous survécu à des injections de 5 fois la dose mortelle, tandis que tous les témoins, avec une seule dose mortelle, ont succombé en 24 à 30 heures.

Avec le staphylocoque, les résultats ont été identiques et les animaux préparés ont pu résister à 6 et 8 doses mortelles, tandis que tous les témoins sont morts en 24 à 32 heures.

J'ai cherché à répéter ces expériences avec des cultures de streptocoques et de gonocoques, mais je n'ai pas pu y parvenir. Il m'a été en effet impossible d'entraîner la mort des animaux avec des injections intra-péritonéales de gonocoques; avec le streptocoque, je n'ai pas pu déterminer la dose mortelle, parce que j'expérimentais sur le cobaye qui lui résiste bien.

Il est donc possible par une injection intra-péritonéale de sérum de cheval chauffé de provoquer une polynucléose consi-

dérable dans la séreuse, cette polynucléose a pour conséquence une phagocytose des microbes injectés, suffisamment intense et rapide pour permettre aux animaux de résister à l'injection intra-péritonéale de 5 à 8 doses mortelles de microbes pathogènes.

Pour utiliser cette méthode chez l'homme au point de vue chirurgical il faut distinguer deux catégories de cas : ceux dans lesquels l'intervention chirurgicale porte sur un péritoine non infecté, et ceux dans lesquels l'infection de la séreuse existe déjà.

Les premiers sont les seuls dans lesquels puissent se trouver réalisées les conditions expérimentales. On pourrait alors faire une injection de sérum dans le péritoine 24 heures avant l'opération : mais l'injection présente des difficultés; on risque de piquer l'intestin et d'injecter le sérum dans sa cavité. Il est vrai que l'on pourrait souvent parer à cet accident en faisant l'injection, le malade étant dans la position inclinée de Trendelenburg; mais nous ne croyons pas qu'il y ait à cela un gros avantage. En effet, au cours de l'opération, l'exsudat péritonéal provoqué par le sérum s'écoulera au dehors, ou sera épongé par les compresses, et le malade perdra le bénéfice de son injection préventive. Il est donc préférable, croyons-nous, de verser le sérum dans le péritoine à la fin de l'opération, avant de refermer l'abdomen. Dans la seconde catégorie de cas, il ne peut être question d'injection préventive de sérum avant l'opération, puisque les malades ont déjà de l'infection péritonéale localisée ou généralisée.

Il faudrait donc, après avoir évacué le liquide septique de l'abdomen, après avoir traité comme il convient les lésions (appendicite, salpingite, perforation intestinale, etc.), assécher aussi complètement que possible la cavité péritonéale, et y verser une certaine quantité de sérum de cheval (20 c. c. par exemple) avant de suturer la paroi. On aurait ainsi enlevé la majeure partie des microbes, et la polynucléose due au sérum viendrait permettre une phagocytose rapide des éléments microbiens restés dans la séreuse.

Nous nous sommes demandé si le sérum de cheval chauffé ne pourrait pas avoir une action agglutinante sur les microbes pathogènes. Nous avons essayé à ce point de vue l'action du

sérum de cheval sur une émulsion de colibacilles : l'agglutination s'est produite au bout de 2 heures avec le sérum de bœuf tandis qu'elle a été presque immédiate avec le sérum de cheval.

Mais les microbes pathogènes que l'on peut rencontrer dans les infections péritonéales sont-ils tous agglutinés par les sérums de cheval? Nous ne saurions le dire. Nous avons essayé de comparer l'action du sérum de cheval sur différentes races de colibacilles et nous avons trouvé des différences considérables.

Dans une première expérience, nous avons pris 5 échantillons de colibacilles de provenances diverses, en cultures de 24 heures sur gélose inclinée. Chaque culture a été émulsionnée dans 10 c. c. d'eau physiologique et nous avons ajouté à 1 c. c. de l'émulsion 1, 3 et 5 gouttes de sérum de cheval chauffé.

L'agglutination s'est produite en 2 heures pour un échantillon, en 24 heures pour 3 autres; elle a complètement fait défaut pour le cinquième.

Nous avons renouvelé la même expérience avec 10 races de bacterium coli de différentes provenances, et en n'ajoutant que 1 dixième de goutte, 5 dixièmes de goutte et une goutte de sérum.

L'agglutination a eu lieu en 24 heures avec 1 dixième de goutte de sérum pour 4 échantillons, avec 1 cinquième de goutte pour 2 autres, avec une goutte pour 2 autres encore ; enfin 2 races de colibacilles sont restées inagglutinables par le sérum de cheval chauffé.

On ne peut donc compter d'une façon constante sur l'action agglutinante du sérum ; mais elle peut exister et dans ce cas elle est très favorable, car elle se manifeste rapidement et donne, pour ainsi dire, le temps aux polynucléaires d'affluer pour phagocyter les germes microbiens.

Convaincu de l'action utile du sérum déposé dans la cavité péritonéale à la fin d'une intervention chirurgicale, certain d'ailleurs de son innocuité, nous l'avons utilisé dans un bon nombre de cas chez l'homme. Les résultats que nous avons obtenus ont été conformes à ce que l'expérimentation permettait de prévoir et nous avons obtenu des guérisons dans des cas d'infection grave et même généralisée du péritoine.

Ces observations cliniques sont l'objet d'un travail que nous publierons prochainement autre part.

Chez quelques-uns de mes malades j'ai observé une éléva-

tion passagère de la température, l'état général restant d'ailleurs excellent; j'ai cherché quelle en pouvait être la cause, je me suis demandé si les injections intra-péritonéales de sérum chauffé ou d'eau physiologique ne pouvaient pas déterminer une élévation thermique par elles-mêmes.

Pour résoudre cette question, j'ai fait des expériences sur les cobayes.

J'ai constaté que les cobayes ayant reçu 4 c. c. d'eau physiologique avaient une élévation thermique à peine appréciable si l'on compare leur température à celle des témoins.

En injectant du sérum de bœuf chauffé, la température s'élève de 9/10 à 1° 6/10, tandis que celle des témoins ne varie que de 5/10.

Enfin, l'injection de sérum de cheval chauffé détermine une oscillation thermique qui varie de 7/10 à 2° 4/10, tandis que la température des témoins, prise en même temps, ne varie que de 1° 1/10 au maximum. En outre, l'élévation thermique ne paraît pas en rapport avec la dose de sérum injectée, puisqu'elle n'a été que de 1° 4/10 pour une injection de 4 c. c. tandis qu'elle était de 2° 4/10 pour 2 c. c.

Encore faut-il ajouter qu'il semble y avoir, dans l'élévation thermique avec une même dose, des variations individuelles assez considérables, puisque chez 2 cobayes ayant reçu chacun 2 c. c. de sérum, la température a monté de 7/10 chez l'un et de 2° 4/10 chez l'autre. On ne peut donc conclure qu'une seule chose, c'est que l'injection intra-péritonéale de sérum chauffé peut amener une élévation thermique passagère et inconstante.

Nous pouvons donc dire, en résumé, que l'injection intra-péritonéale de sérum de cheval chauffé détermine une polynucléose abondante et une phagocytose assez active pour permettre aux animaux de résister à 5 ou 8 doses mortelles de microbes pathogènes.

Ce sérum a une action agglutinante inconstante et son injection dans le péritoine peut amener une élévation thermique passagère et sans gravité. Chez l'homme, il peut rendre de grands services dans les opérations abdominales, à la fin desquelles on le verse dans le péritoine, soit pour combattre une infection possible, soit pour combattre une infection existant déjà avant l'opération.

Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur

EN 1903

Par M. J. VIALA

Préparateur au service antirabique.

Pendant l'année 1903, 630 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur. 4 sont mortes de rage, soit une mortalité totale de 0,65 0/0. Mais chez 2 d'entre elles, la rage s'est déclarée moins de 15 jours après la fin du traitement, elles doivent être défalquées pour le calcul de la mortalité.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées...........	628
Morts........................	2
Mortalité....................	0,32 0/0

Il est bon de faire remarquer que le chiffre des personnes traitées est le plus faible constaté depuis le fonctionnement du service.

Ceci tient à deux causes : d'abord, à la création de services antirabiques à Lyon, Marseille, Bordeaux, Lille, Montpellier, et en second lieu aux mesures prises par la Préfecture de police contre les chiens errants.

Ces mesures sur la police des chiens, bien qu'incomplètes, ont déjà produit des résultats appréciables; mais dès qu'elles sont abandonnées, les cas de rage augmentent dans le département de la Seine. C'est ce que nous constatons déjà au début de cette année 1904.

Ces simples remarques font voir combien il serait facile, avec de la constance et de la volonté, de diminuer et presque de faire disparaître les chiens enragés. Et aussi quelle recrudescence de rage il y a, dès que toutes mesures de prophylaxie sont abandonnées.

Chiffres fournis par les statistiques des années précédentes .

ANNÉES	PERSONNES TRAITÉES	MORTS	MORTALITÉ
1886	2671	25	0.94 0/0
1887	1770	14	0.79
1888	1622	9	0.55
1889	1830	7	0.38
1890	1540	6	0.32
1891	1559	4	0.25
1892	1790	4	0.22
1893	1648	6	0.36
1894	1387	7	0.50
1895	1520	5	0.33
1896	1308	4	0.30
1897	1521	6	0.39
1898	1465	3	0.20
1899	1614	4	0.25
1900	1420	4	0.35
1901	1321	6	0.38
1902	1105	2	0.18
1903	628	2	0.32

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A : la rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B : la rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C : l'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories de personnes :

	MORSURES A LA TÊTE			MORSURES AUX MAINS			MORSURES AUX MEMBRES			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité
Tableau A.......	7	1	14.2	72	»	»	37	»	»	116	1	0.86
Tableau B.......	17	»		128	»	»	79	»	»	224		
Tableau C.......	14	»		139	»	»	135	1	0.74	288	1	0.34
	38			239	»	»	251			628	2	0.32

III

Au point de vue de leur nationalité, les 630 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Maroc	1
Suisse	1
Hollande	5
Turquie	2
Angleterre	1

Soit 10 étrangers et 620 Français.

Voici la répartition par départements des 620 Français.

Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que 5 instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois : Lille, Marseille, Montpellier, Lyon, Bordeaux, drainent les mordus des régions environnantes.

DÉPARTEMENTS

Aisne	2	Gers	4	Oise	5
Allier	9	Ile-et-Vilaine	6	Orne	8
Alpes (Basses-)	1	Isère	1	Pas-de-Calais	2
Alpes-Maritimes	1	Indre	10	Puy-de-Dôme	16
Ardèche	2	Indre-et-Loire	6	Pyrénées-Orientales	1
Aveyron	5	Jura	1	Pyrénées (Hautes-)	2
Bouches-du-Rhône	1	Loire (Haute-)	4	Sarthe	3
Cantal	20	Loire-Inférieure	14	Savoie (Haute-)	5
Calvados	7	Loiret	2	Sèvres (Deux-)	8
Cher	6	Loir-et-Cher	4	Seine-et-Marne	3
Charente	4	Lot	7	Seine-Inférieure	29
Charente-Inférieure	6	Lot-et-Garonne	0	Seine et-Oise	30
Côtes-du-Nord	13	Maine-et-Loire	3	Seine	178
Corrèze	30	Manche	6	Somme	16
Creuse	15	Mayenne	8	Vaucluse	1
Dordogne	4	Meurthe-et-Moselle	2	Vendée	6
Eure	2	Meuse	4	Vienne	7
Eure-et-Loir	5	Morbihan	6	Vienne (Haute-)	9
Finistère	51	Nièvre	8	Yonne	1
Garonne (Haute-)	11	Nord	1		

PERSONNES TRAITÉES MORTES DE RAGE MOINS DE 15 JOURS APRÈS LA FIN DU TRAITEMENT

D'H... Jacques, 9 ans, chez ses parents, à Fouras (Charente-Inférieure) : mordu à la jambe droite, 2 plaies énormes ayant déchiré les muscles; ces plaies s'étendent aux deux tiers de la circonférence de la jambe.

Le chien a été reconnu enragé par un vétérinaire.

D'H... a été traité du 28 juillet au 11 août.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 16 août, il est mort le 22 août.

Le même chien a mordu deux autres personnes qui ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur et qui se portent bien : ces derniers avaient des morsures beaucoup moins graves que D'H...

A... Charles, 30 ans, garçon laitier, boulevard Victor-Hugo, à Clichy (Seine) : mordu le 15 février à la main droite, 3 morsures profondes à la face dorsale.

Le chien a été reconnu enragé par un vétérinaire.

A... a été traité du 16 février au 5 mars.

La rage a débuté par de fortes douleurs à la main droite. Il est mort le 15 mars.

PERSONNES TRAITÉES MORTES DE RAGE APRÈS LE TRAITEMENT

B... André, 5 ans, chez ses parents, à Villemomble (Seine) : mordu à la joue droite, 1 forte morsure pénétrante, par un chien errant.

B... est traité du 5 au 25 mars.

Un chien mordu en même temps que B... est mort de rage le 12 avril.

Le 27 avril, l'enfant B... est mouillé toute la journée, il rentre le soir frissonnant. Le 28 avril, il boit et mange difficilement. Le 29 avril, il est amené à l'hôpital Pasteur; on constate de l'aérophobie et de l'hydrophobie. Il succombe dans la nuit du 29 au 30 avril.

Le bulbe de B..., inoculé, sous la dure-mère, à plusieurs lapins, ne leur a pas donné la maladie. Ces animaux ont été gardés bien portants pendant plus de 7 mois.

C... Constant, 7 ans, chez ses parents, rue Clignancourt, à Paris : mordu le 13 septembre à la cuisse gauche par un chien errant, est traité du 13 au 30 septembre, meurt le 25 octobre.

Le bulbe de C..., inoculé sous la dure-mère à des lapins, a donné la rage le 15e jour.

Le gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE JUILLET 1904 N° 7

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Études sur quelques épizooties
DE L'INDO-CHINE

PAR LE Dr YERSIN

(PREMIER MÉMOIRE)

(Travail du laboratoire de Nhatrang.)

I

INTRODUCTION

Périodiquement éclatent et se propagent dans toutes les régions de l'Indo-Chine des épizooties qui causent une mortalité souvent énorme parmi les animaux de travail.

Il en résulte une gêne considérable pour les travaux agricoles et la presque impossibilité, pour les colons, de se livrer à l'élevage et à l'amélioration de la race bovine.

L'Institut Pasteur de Nhatrang, dès sa création, s'est préoccupé de ce grave problème; il consacre depuis huit ans presque tous ses efforts à des études sur les épizooties de l'Indo-Chine.

Nous n'avons encore fait aucune publication détaillée de nos travaux. Il n'existe sur les recherches du laboratoire que quelques rapports sommaires adressés par le directeur du laboratoire au gouverneur général de l'Indo-Chine[1].

Je crois le moment venu de publier un travail d'ensemble sur les recherches entreprises à Nhatrang au sujet des épizooties.

1. *Bulletin économique de l'Indo-Chine.* — Année 1899 : Expériences sur la peste bovine. — Année 1900 : L'Institut Pasteur de Nhatrang. — Année 1901 : instructions pour l'emploi du sérum contre la peste bovine. — Année 1903 : Barbone. — Charbon au Tonkin.

Je m'efforcerai de marquer les étapes parcourues, de mettre en lumière les faits acquis, de signaler ceux qui restent douteux ou encore obscurs.

Historique. — Au cours de ce travail, les résultats obtenus par les divers bactériologistes qui se sont succédé au laboratoire seront repris et discutés; je me bornerai donc ici à un un historique succinct des recherches faites à Nhatrang sur les épizooties.

Le 13 décembre 1897, MM. Carré et Fraimbault, attachés au laboratoire de Nhatrang, commençaient à Hanoï une série d'expériences sur une épizootie qui sévissait alors avec violence sur les bovidés du Tonkin. Après quelques tâtonnements, ils réussissaient à reproduire expérimentalement la maladie et pouvaient transporter à Nhatrang du virus vivant.

A la suite de longues et minutieuses études, ils concluaient que l'épizootie étudiée par eux au Tonkin était la *peste bovine.* Puis, appliquant les méthodes employées au Transvaal, en Russie, à Constantinople, ils réussissaient à préparer un sérum antipestique.

Ce sérum fut essayé à plusieurs reprises au Tonkin avec succès. M. Carré se rendit lui-même au Cambodge en 1898, et put pratiquer, en pleine région infectée de peste bovine, une série de vaccinations dont les résultats excellents ont fait l'objet d'un rapport consigné au *Bulletin économique de l'Indo-Chine*[1].

Vers le milieu de 1900, MM. les vétérinaires Carougeau et Blin succédèrent à MM. Carré et Fraimbault au laboratoire de Nhatrang.

Mes nouveaux collaborateurs, ne reconnaissant pas, dans les symptômes de la maladie étudiée à Nhatrang, tous les caractères décrits dans les ouvrages classiques pour caractériser la peste bovine, crurent pouvoir affirmer que la peste bovine de l'Indo-Chine n'était que de la *Septicémie hémorrhagique* ou *Pasteurellose* des bovidés.

On a donné ce nom à une maladie des bovins étudiée et décrite surtout par M. le vétérinaire Lignières[2]. Cette maladie,

1. *Bulletin économique de l'Indo-Chine.* — Année 1899 : Expériences sur la peste bovine.
2. *Bulletin de la Société centrale vétérinaire.*— Années 1898, 1900 : Lignières, La pasteurellose bovine.

qui affecte des formes cliniques très diverses, est toujours causée par un microbe ovoïde de la classe des Pasteurella.

En novembre 1902, MM. Carougeau et Blin me soumettaient un mémoire dans lequel ils déclaraient que « la maladie désignée en Indo-Chine sous le nom de peste bovine n'est qu'une septicémie hémorrhagique du groupe des pasteurelloses ».

Les expériences relatées dans ce travail ne me parurent pas convaincantes, et je combattis l'opinion de mes collaborateurs.

Leur mémoire fut cependant présenté par eux à la Société des études indo-chinoises. Cette société le publiait dans son *Bulletin* sous le titre : « La pasteurellose bovine en Indo-Chine (prétendue peste bovine). » En même temps ce travail paraissait dans le *Recueil de médecine vétérinaire* (février 1902).

Quelques personnes acceptèrent trop facilement, à mon avis, les conclusions de MM. Carougeau et Blin; depuis lors, toutes les épizooties qui se sont succédé en Indo-Chine sont considérées comme de la Septicémie hémorrhagique.

Je tiens à bien établir que je n'ai jamais partagé l'opinion de MM. Carougeau et Blin, et je ne voudrais pas être rendu responsable de conclusions que j'ai repoussées.

Malheureusement Blin est mort à Saïgon en décembre 1902 et M. Carougeau est alors rentré en France. Il me fut donc impossible de reprendre ces études avec eux. M. Schein, vétérinaire, qui leur a succédé au laboratoire depuis plus d'une année, a exécuté, sur mes indications, une série d'expériences qui me permettent d'apporter aujourd'hui un peu de lumière dans cette question des épizooties des bovidés de l'Indo-Chine.

II

LA PESTE BOVINE EXISTE EN INDO-CHINE A L'ÉTAT ENDÉMIQUE

Un des arguments principaux des personnes qui ne croient pas à l'existence de la peste bovine en Indo-Chine repose sur une différence profonde qui existerait entre la maladie appelée par nous peste bovine et la peste, telle qu'elle est décrite dans les ouvrages classiques vétérinaires. Il me paraît donc nécessaire de résumer avec quelques détails ce que dit à ce sujet l'ouvrage

de Nocard et Leclainche intitulé : *Maladies microbiennes des animaux.*

Voici ce que nous y lisons au chapitre « Peste bovine » :

« La peste bovine ou typhus contagieux est une maladie virulente, inoculable, caractérisée par un état typhoïde extrêmement grave et par des accidents spécifiques sur les muqueuses.

« Elle frappe principalement les bovidés sous la forme d'épizooties rapidement envahissantes, détruisant la quasi-totalité du bétail dans les régions atteintes.

« Permanente dans l'Europe orientale et *dans toute l'Asie,* la peste ne s'étend qu'exceptionnellement à l'Europe occidentale.

« Il est prouvé aujourd'hui que le sang et les tissus des animaux malades de peste bovine, quoique virulents et inoculables, ne renferment *aucun microbe apparent,* et que leur ensemencement dans les milieux usuels, à l'air ou dans le vide, reste stérile.

« Les bovidés sont particulièrement aptes à l'évolution de la peste. *Le buffle peut aussi être affecté, mais la maladie évolue sous une forme atténuée le plus souvent.*

« Parmi les petits animaux, *le cobaye seul a pu être infecté expérimentalement* (Gamaléia, Semmer).

« *Symptômes.* — La maladie débute comme les fièvres éruptives par une élévation rapide de la température. De 38°5 à 39°, chiffre normal, elle monte en 24 à 48 heures à 40°5 et 41°. Dès le 2e jour, on observe un état d'abattement de plus en plus accentué. Les muqueuses sont injectées. A une période plus avancée, la prostration est absolue et la faiblesse extrême. L'animal reste couché, a des frissons, grince des dents. La conjonctive est infiltrée, couverte de taches ecchymotiques ; il y a du larmoiement et de la salivation. Les excréments, d'abord durs, deviennent mous, puis liquides, et sont mélangés de sang.

« Plus tard les muqueuses s'altèrent de plus en plus ; la pituitaire (muqueuse nasale) est infiltrée et recouverte d'un exsudat muco-purulent. L'animal a du jetage.

« Une diarrhée intense s'établit ; l'animal maigrit rapidement, la température s'abaise au-dessous de la normale et la mort survient.

« Sous cette forme grave, qui est la règle en Europe, la maladie évolue en 4 à 7 jours. Quelques animaux succombent dès le

2e jour. Dans quelques cas, les symptômes présentent une moindre intensité; l'évolution n'est complète qu'en 8 à 12 jours et la guérison est possible.

« La peste se termine par la mort dans la très grande majorité des cas. La moyenne générale des statistiques publiées donne un taux de mortalité de 75 0/0 des malades. Cependant, il est à cet égard des différences considérables suivant les races affectées et suivant les épizooties considérées. Dans l'Europe occidentale, le taux des pertes varie entre 50 et 98 0/0. Dans la Russie méridionale, le bétail résiste mieux à la peste et *les pertes sont évaluées en moyenne à* 30-40 0/0 *des animaux affectés.*

« *Lésions.* — Le cadavre est amaigri; il présente de nombreuses ecchymoses sous-cutanées. Le péritoine est congestionné et contient un liquide rosé.

« Tous les viscères sont congestionnés : le foie est jaune, friable; la vésicule biliaire est distendue et contient un liquide abondant. Le poumon est congestionné et présente presque toujours de l'emphysème limité à une partie de l'organe ou généralisé.

« La muqueuse digestive est le siège d'une congestion intense et d'une desquamation épithéliale plus ou moins marquée selon les régions. Dans la bouche, on observe fréquemment des érosions. La caillette est tout particulièrement atteinte; sa muqueuse est en partie dénudée de son épithélium.

« Dans l'intestin grêle, il y a des hémorrhagies sous-muqueuses; les follicules solitaires et les plaques de Peyer sont détruits.

« Des lésions de même ordre, moins accentuées, se retrouvent dans le gros intestin, le côlon flottant et le rectum.

« La muqueuse respiratoire est injectée et parsemée de taches ecchymotiques. *Au niveau de la trachée et des grosses bronches, la muqueuse est recouverte par des fausses membranes jaunâtres formant un revêtement épais. (Exsudat croupal.)*

« *Résistance du virus.* — On ne possède sur cette question que des documents peu précis. Il est cependant admis que la dessiccation assure une stérilisation rapide; deux jours de dessiccation suffisent pour détruire la virulence du sang.

« La solution saturée de sel marin n'altère pas la virulence; au contraire, la glycérine stérilise très rapidement les objets virulents qui sont mis en contact avec elle.

« D'après certains auteurs, la virulence persisterait plusieurs semaines et même plusieurs mois dans les cadavres enfouis ou dans les écuries infectées. »

Telle est en résumé l'opinion des maîtres en science vétérinaire.

Nous verrons tout à l'heure si la maladie observée en Indo-Chine diffère notablement de la description donnée dans « Les maladies microbiennes des animaux ».

Observations de Koch au Transvaal[1]. — Je remarquerai tout d'abord que M. Koch, qui a étudié en 1897 une grave épizootie de peste bovine au Transvaal, signale que : « Les symptômes et les lésions de la peste bovine au Cap diffèrent sur certains points de la peste bovine classique. Ainsi les altérations exanthématiques et diphtéritiques des muqueuses de la bouche et des voies respiratoires ne sont que peu marquées au Cap. »

M. Koch confirme la sensibilité du virus à la dessiccation : du sang desséché pendant quatre jours seulement a perdu toute virulence. Il insiste sur l'action antiseptique de la glycérine, qui détruit en peu d'heures la virulence du sang.

M. Koch a déterminé la maladie mortelle en inoculant des doses très petites de sang défibriné; ainsi un animal inoculé avec 1/50 centimètre cube de sang virulent est mort aussi vite que les témoins.

Le lapin et le cobaye se sont montrés absolument réfractaires à la peste bovine.

Travaux de M. Nicolle. — M. Nicolle a étudié à Constantinople la peste bovine qui sévit d'une façon permanente dans l'empire ottoman. Il a publié dans les Annales de l'Institut Pasteur trois mémoires très intéressants sur cette question.

Voici quels sont les symptômes et les lésions de la peste bovine en Turquie, tels que les décrit M. Nicolle[2].

L'incubation est de trois jours pleins, puis la température de l'animal s'élève rapidement à 40°-41°. Au 6e ou 7e jour (après l'inoculation), on observe de l'inappétence et de la constipation. L'animal est triste, les poils sont hérissés, les yeux larmoyants, la salivation est exagérée. On observe souvent un liséré

1. Koch, *Reiseberichte* (Berlin, 1898).

2. *Annales de l'Institut Pasteur* : 1er mémoire, année 1899 : — 2e mémoire, année 1901; — 3e mémoire, année 1902.

congestif de la muqueuse buccale, au niveau des incisives.

Aux 8e et 9e jours, l'état général s'aggrave : l'animal est abattu, indifférent; il grince des dents, tousse par moments; il a des tremblements musculaires au niveau des flancs. On observe dans la bouche des érosions irrégulières à fond saignant et à odeur fétide. La conjonctive s'injecte, des larmes muco-purulentes s'écoulent constamment des yeux. Un jetage, également muco-purulent, s'établit. Enfin, la constipation fait place à une diarrhée intense alimentaire, puis séreuse, souvent sanglante.

Les 9e ou 10e jour, la température, qui s'était maintenue autour de 41° sans rémissions notables, s'abaisse au-dessous de 40°. L'animal reste couché, maigrit à vue d'œil. L'hypothermie s'accuse de plus en plus et la mort arrive du 10e au 11e jour, rarement plus tard.

A l'autopsie, on retrouve les lésions buccales dont nous avons parlé. La pituitaire est congestionnée, parfois semée de pétéchies. Dans la caillette, on constate de la congestion souvent accompagnée d'un piqueté hémorrhagique. L'intestin grêle est congestionné et présente souvent un granité hémorrhagique. Les ulcérations et les lésions des follicules sont peu communes. Dans le gros intestin, toutes ces altérations sont rares.

La rate n'est jamais hypertrophiée.

Le foie, congestionné, est jaune verdâtre. La vésicule biliaire distendue de liquide.

Les poumons montrent un emphysème discret des lobes antérieurs.

M. Nicolle a observé que certaines races de bovidés sont plus sensibles que d'autres à la peste bovine. Parmi les plus sensibles, il cite les races de Crimée, d'Alep, d'Égypte, d'Anatolie. La race grise de Roumélie se montre au contraire moins réceptive.

En Turquie, la peste bovine est presque toujours compliquée de fièvre du Texas, maladie causée par un hématozoaire, le « piroplasma bigeminum ».

M. Nicolle a constaté que chez les animaux infectés tout est virulent : humeurs, viscères, déjections. Le sang infecte constamment les sujets sensibles. à la dose d'une goutte (1/20 c. c.) et même à 1/60 c. c., M. Nicolle a inoculé sans succès 1/1,000 c. c. (une seule expérience.)

Du sang défibriné et étendu au dixième filtré sur bougie Berkefeld, s'est montré actif. *Le virus de la peste bovine traverse donc les bougies les plus poreuses, il est donc très petit et rentre dans la catégorie des microbes invisibles.*

Les animaux ont été infectés par diverses méthodes, qui, toutes, se sont montrées efficaces : inoculation sous-cutanée, intraveineuse, intratrachéale, cohabitation, badigeonnage des muqueuses avec du sang, des déjections, etc.

La quantité de virus injecté n'a aucune influence sur la marche de la maladie; elle est la même, que l'on injecte une dose une fois mortelle ou une dose un million de fois mortelle.

Le sang défibriné ou non et conservé en pipette perd rapidement son activité. Après une semaine de séjour à la glacière, il est devenu inactif. La virulence disparaît beaucoup plus vite à la température de l'air en été : au bout de trois ou quatre jours, le sang placé dans ces conditions a perdu toute virulence.

En prenant des précautions toutes spéciales, M. Nicolle est arrivé à conserver du sang virulent pendant 32 jours.

Les petits animaux de laboratoire : pigeon, lapin, cobaye, sont absolument réfractaires à la peste bovine.

Les animaux guéris de la maladie naturelle possèdent une immunité solide et durable. On peut arriver à immuniser solidement des animaux en leur injectant à la fois une dose suffisante de sérum d'animal guéri et du sang virulent. Il est préférable d'hyperimmuniser certains sujets qui fourniront ainsi un sérum plus actif et pouvant être employé à plus faible dose.

M. Nicolle hypérimmunise les veaux en leur injectant en même temps une dose suffisante de sérum (20 c. c. par exemple) et 2 litres de sang d'un animal malade. Au bout de 15 jours, l'animal ainsi traité est bon à saigner et fournira un sérum très actif. Pour maintenir l'animal en état, il suffira dans la suite de lui injecter périodiquement, tous les mois, par exemple, une forte dose de sang virulent (2 à 4 litres).

Plus tard, M. Nicolle a perfectionné son procédé : il a remarqué que si l'on injecte dans le péritoine d'un veau malade 6 à 8 litres d'eau salée à 8/1,000, et que, 3 heures plus tard, on retire ce liquide, celui-ci est devenu virulent et peut remplacer le sang avec avantage pour la préparation des animaux

à sérum. M. Nicolle croit, toutefois, que le liquide provenant du lavage péritonéal est moins riche en germes que le sang de l'animal.

Comparaison de ces divers travaux. — La lecture attentive des travaux sur la peste bovine que nous avons résumés ci-dessus nous démontre que, sur plusieurs points, Koch et Nicolle sont en désaccord avec quelques-unes des assertions des ouvrages classiques.

Je signalerai en particulier la réceptivité du cobaye à la peste bovine, affirmée par Gamaleïa et Semmer, niée par Koch et Nicolle.

Les lésions croupales de la trachée et des grosses bronches, décrites dans « Les maladies microbiennes des animaux » n'ont été observées ni au Transvaal ni à Constantinople.

La longue conservation du virus, affirmée par certains vétérinaires, semble être en contradiction avec les expériences de laboratoire qui nous démontrent, au contraire, la fragilité excessive du virus de la peste bovine.

D'où peuvent provenir ces contradictions? Elles sont, me semble-t-il, facilement explicables.

Dans un ouvrage classique, les maladies sont décrites avec des détails provenant non seulement des observations personnelles des auteurs, mais aussi de celles d'autres savants ayant écrit sur le même sujet. Il en résulte un tableau clinique plus complet sans doute, mais qui risque de ne pas s'appliquer intégralement à tous les cas particuliers.

Ainsi, en ce qui concerne la peste bovine, les lésions croupales ont dû être observées chez certaines races d'animaux ultra-sensibles, en France, par exemple, mais elles peuvent être moins marquées ou nulles dans d'autres pays, où la sensibilité à la peste est moindre et où les races de bovidés sont autres.

La réceptivité du cobaye à la peste bovine, la conservation de la virulence dans des cadavres enfouis depuis plusieurs mois sont probablement des erreurs d'observation.

On a pu confondre la peste bovine avec d'autres épizooties ayant des symptômes semblables [1] et décrire sous le nom de

1. Dernièrement, en Espagne, des vétérinaires ont cru à une épizootie de peste bovine, alors qu'il ne s'agissait que de fièvre aphteuse très virulente.

peste plusieurs maladies différentes, autrefois confondues, aujourd'hui bien différenciées.

Symptômes et lésions de la peste bovine en Indo-Chine. — Voici maintenant la description de la maladie, telle que nous l'avons observée au laboratoire de Nhatrang[1].

Chez les veaux infectés, après une incubation d'une durée moyenne de 3 jours, la température s'élève, dépasse 40° et se maintient très haute sans rémissions. En même temps, apparaissent la tristesse, l'inappétence, la constipation; les veaux ont le mufle sec; ils restent volontiers couchés, ont des frissons, grincent des dents. Du 6e au 8e jour après l'inoculation, on remarque du larmoiement, du jetage muco-purulent, de la diarrhée qui est fréquemment mélangée de sang. Les animaux ne mangent plus, toussent, maigrissent considérablement; ils sont épuisés par une diarrhée profuse; la température redevient normale, puis descend au-dessous de la normale; l'agonie commence et la mort peut survenir à partir du 9e jour[2].

La description que nous venons de donner des symptômes de la maladie ne s'applique pas intégralement à tous les cas; tel symptôme peut être plus ou moins accentué ou manquer complètement : ainsi nous avons vu des veaux mourir sans avoir présenté de jetage, de larmoiement, ni de toux, etc.

Les seuls symptômes constants, que nous avons presque toujours observés chez les animaux infectés par nous, ont été la durée de l'incubation, la période d'hyperthermie sans rémission et la diarrhée.

Il serait encore plus difficile de donner un tableau général des lésions trouvées à l'autopsie. Il est probable que la diversité que nous avons observée provient en grande partie de la durée très variable de la maladie chez des bovins indo-chinois.

Nous avons fréquemment trouvé de la congestion pulmonaire, des ulcérations véritables des follicules de l'intestin chez les animaux ayant succombé après plus de 15 jours.

1. Le virus provenait d'une épizootie du Tonkin et avait été rapporté à Nhatrang par MM. Carré et Fraimbault, en janvier 1898.

2. Sur plusieurs centaines de cas de peste bovine mortelle, nous avons constaté que la mort est survenue (à partir du jour de l'inoculation) :

Du 6e au 15e	jour	dans	37 0/0	des cas.
Du 16e au 29e	—	—	54 0/0	—
Du 30e au 60e	—	—	9 0/0	—

Les excoriations de la muqueuse buccale sont assez rares. La congestion avec piqueté hémorrhagique de la caillette, de l'intestin grêle, sont des lésions constantes. La muqueuse trachéale et bronchique est souvent congestionnée, mais nous ne l'avons jamais vue recouverte de fausses membranes croupales. L'emphysème pulmonaire des lobes antérieurs est une lésion constante.

La rate est normale.

Le foie est souvent jaune verdâtre et la vésicule biliaire est distendue par la bile.

Modes d'inoculation. — Nous avons infecté presque toujours nos animaux d'expérience en les inoculant avec du sang d'un animal malade pris vers le milieu de la période (6e ou 7e jour après l'inoculation).

Nous avons observé plus d'une fois qu'après la mort, surtout si elle survient tardivement, le sang n'est plus virulent. De même nous n'avons pas réussi à donner l'infection avec le sang, les excréments ou l'urine d'animaux en période d'hypothermie.

Le contact, même de courte durée, d'un animal sain et d'un animal malade a presque toujours réussi à provoquer l'infection.

Les inoculations de sang virulent ont été faites avec succès sous la peau, dans les veines, dans le péritoine, dans la trachée; certaines expériences nous laissent croire que l'inoculation intratrachéale provoque une maladie plus sévère et plus souvent mortelle.

La gravité de la maladie ne dépend nullement de la quantité de virus inoculée. Des animaux inoculés avec 1/10 c.c. de sang virulent ont contracté la maladie aussi bien que ceux qui recevaient 10 centimètres cubes de sang. Il semble même que les faibles doses soient préférables ainsi que le démontrent les expériences suivantes :

Expérience n° 1. — Trois veaux sont inoculés : le premier avec 10 c.c. de sang virulent; le 2e avec 1/10 c.c.; le 3e avec 1/100 c.c. du même sang. — Le veau n° 1 contracte une maladie bénigne; le veau n° 2, une maladie assez grave; le veau n° 3, seul, prend une maladie mortelle.

Expérience n° 2. — Trois veaux sont inoculés : Le premier avec 10 c.c. de sang virulent ; le 2e avec 2 c.c.; le 3e avec 1 c.c. du même sang. — Les veaux 2 et 3 seuls contractent une maladie mortelle. Le veau n° 1 guérit après avoir eu une maladie assez grave.

Conservation du virus. — La conservation du sang virulent est difficile. MM. Carré et Fraimbault ont fait de nombreuses expériences à ce sujet. D'une façon générale, le sang vieux de quatre jours ne tue plus sûrement les animaux inoculés.

Le petit tableau ci-joint résume nos expériences sur le vieillissement du sang.

Nombre des essais.	Age du sang	Résultats positifs.	Résultats négatifs.	Observations.
1	4 jours	1	—	
1	6 —	—	1	
5	8 —	3	2	
1	9 —	—	1	
1	10 —	1	—	
1	12 —	—	1	
6	15 —	2	4	Rate conservée dans de l'eau salée.
1	18 —	—	1	
1	26 —	—	1	

Le sang desséché perd très rapidement sa virulence :

Expérience n° 3. — On met à dessécher dans le vide 2 c. c. de sang virulent. Au bout de 48 heures, on dilue 0gr. 4 de résidu sec dans 2 c. c. d'eau stérilisée et on inocule un veau (n° 133 de nos registres). — Aucun résultat. — L'animal est inoculé ultérieurement avec du sang frais virulent et contracte la maladie ordinaire.

La glycérine, lorsqu'on la laisse agir quelque temps sur du sang virulent, semble exercer une véritable action antiseptique sur le virus de la peste bovine, qui perd toute activité.

Expérience n° 4. — On mélange 1 c. c. de sang virulent avec 1 c. c. de glycérine et on inocule *aussitôt* à un veau (n° 164 de nos registres). — L'animal contracte la maladie ordinaire.

Expérience n° 5. — On mélange 0, 5 c. c. de sang virulent avec 1 c. c. de glycérine. On laisse agir pendant 2 jours et on inocule à un veau (n° 118 de nos registres). — Aucun résultat. — L'animal, éprouvé ultérieurement avec du sang virulent prend la maladie ordinaire.

Expérience n° 6. — On mélange 1 c. c. de sang virulent avec 1 c. c. de glycérine; 4 heures plus tard, le mélange est injecté à un veau (n° 172 de nos registres). — Aucun résultat. — Le veau est ultérieurement éprouvé avec du sang virulent : il contracte la maladie ordinaire.

Filtration du virus. — Nous avons constaté, comme M. Nicolle que le virus traverse les filtres poreux. Nous avons employé,

pour nos expériences, le liquide de lavage péritonéal et les bougies Chamberland marque B et marque F. — Le virus est arrêté par la bougie B, mais traverse constamment la bougie F.

Expérience n° 7. — Le 15 janvier 1904, on stérilise à l'autoclave quelques litres d'eau salée à 8/1,000. La solution, stérilisée et refroidie, est injectée dans la cavité péritonéale d'un veau infecté de peste bovine (8 jours après l'inoculation ; 5e jour de la réaction ; 1 jour avant la mort). — Après un séjour de 4 heures, la solution saline est retirée du péritoine du veau malade. Le liquide est devenu albumineux et légèrement louche. Il ne contient cependant aucun microbe cultivable : des tubes de bouillon ensemencés restent stériles.

On contrôle sa virulence en inoculant 2 veaux et 1 lapin. L'un des veaux reçoit 1 c. c, sous la peau ; le 2e veau 1/100 c. c. ; le lapin 1 c. c. — Le premier veau meurt en 10 jours ; le 2e meurt en 17 jours. Le lapin reste bien portant.

Avant la filtration, on ajoute au liquide de lavage péritonéal le contenu de deux tubes de culture de barbone virulent. Cette opération a pour but de vérifier l'étanchéité aux microbes visibles des filtres que l'on va employer. Si les filtres ne sont pas étanches, le microbe du barbone les traversera ; nous pourrons le constater par l'inoculation du liquide filtré à des lapins, animaux très sensibles au barbone. Si des microbes du barbone ont traversé le filtre, les lapins inoculés mourront.

Le liquide de lavage péritonéal est filtré : partie sur bougie Chamberland B ; partie sur bougie Chamberland F.

Nous savons que la bougie B arrête tous les microbes visibles et invisibles au microscope, tandis que la bougie F arrête bien les microbes visibles au microscope, mais laisse passer un certain nombre de germes invisibles (peste bovine, péripneumonie des bovidés. fièvre aphteuse, clavelée, fièvre jaune, etc.).

Le liquide filtré B (bougie B) est inoculé à la dose de 1 c. c. à un veau et à un lapin : les animaux restent bien portants.

Le liquide filtré F (bougie F) est aussi inoculé à 1 veau et à 1 lapin : chacun reçoit 1 c. c. sous la peau.

Le lapin reste bien portant, tandis que le veau contracte la peste bovine, dont il meurt en 14 jours.

Enfin 1 lapin inoculé avec une trace de la culture de barbone qui a servi pour cette expérience meurt en moins de 12 heures.

J'ai relaté avec quelques détails cette expérience, car son importance est grande. Elle démontre que notre virus pestique contient un microbe invisible. Cette constatation à elle seule nous permettrait d'identifier la peste bovine de l'Indo-Chine avec celle de Constantinople. Elle prouve également l'inexactitude des théories de Carougeau et Blin qui prétendent que la peste

de l'Indo-Chine est une septicémie causée par un microbe visible au microscope (*pasteurella* de Lignières.)

Inoculation aux petits animaux de laboratoire : Le virus de Nhatrang, inoculé aux petits animaux de laboratoire (lapins, cobayes, etc.) ne leur a donné aucune maladie.

Expérience n° 8. — Le 24 septembre 1903, on saigne un veau au 7e jour après l'inoculation (jour de la chute de la température et veille de la mort de l'animal.) — Avec ce sang, on inocule 2 lapins :

Lapin n° 1 reçoit 2 c. c. de sang virulent.

Lapin n° 2 reçoit 5 c. c. de sang virulent.

Le 7 décembre, les lapins sont toujours bien portants.

3 veaux témoins sont inoculés en même temps que les lapins : 2 meurent de peste bovine; le 3e guérit après avoir eu une maladie grave.

Expérience n° 9. — Le 1er octobre 1903, on saigne un veau le 7e jour après l'inoculation (4e jour de la réaction et 2 jours avant la mort.) — Avec ce sang on inocule :

Lapin n° 1 reçoit 5 c. c. sang virulent.

Lapin n° 2 reçoit 5 c. c. de liquide de lavage péritonéal du veau malade.

Le 5 janvier 1904, ces lapins sont toujours en bonne santé, alors qu'un veau témoin, inoculé en même temps que les lapins est mort en 9 jours.

Expérience n° 10. — Un bufflon infecté est saigné le 7e jour après l'inoculation (3e jour de la réaction et 3 jours avant la mort.)

Avec ce sang on inocule :

1 lapin qui reçoit 5 c. c. sous la peau.

4 cobayes qui reçoivent chacun 3 c. c. dans le péritoine.

Aucun de ces animaux n'est malade.

2 veaux témoins ont été inoculés en même temps que les lapins et les cobayes, avec le sang du bufflon : l'un d'eux contracte une maladie mortelle ; l'autre guérit après avoir eu une maladie très grave.

Mortalité de la peste bovine en Indo-Chine. — La mortalité des animaux atteints de peste bovine est extrêmement variable en Indo-Chine. La maladie est en général très sévère lorsqu'elle apparaît dans une région où depuis longtemps il n'y a pas eu d'épizootie. La mortalité des animaux infectés atteint alors facilement 90 0/0 à 100 0/0. Il est cependant à remarquer qu'en général, lorsqu'un gros troupeau est atteint, une fraction importante des animaux peut résister. Cette fraction épargnée sera de 30 0/0, de 60 0/0, de 75 0/0 des animaux du troupeau, selon les cas.

Dans nos expériences de laboratoire, nous avons eu aussi à enregistrer de grandes différences dans la mortalité des animaux

inoculés, sans qu'il nous ait toujours été possible de déterminer la cause de ces irrégularités.

Nous avons pu cependant conserver le même virus par passages successifs de veau à veau pendant *trois ans et trois mois* (180 passages successifs; en moyenne un passage par semaine).

Voici un tableau qui représente la mortalité de nos veaux de passage par trimestres, de janvier 1898 à mars 1901 :

Janvier, février, mars 1898.........	Mortalité.	= 68 0/0
Avril, mai, juin 1898...............	—	= 70 0/0
Juillet, août, septembre 1898.......	—	= 35 0/0
Octobre, novembre, décembre 1898.	—	= 31 0/0
Janvier, février, mars 1899........	—	= 26 0/0
Avril, mai, juin 1899...............	—	= 43 0/0
Juillet, août, septembre 1899......	—	= 20 0/0
Octobre, novembre, décembre 1899..	—	= 17 0/0
Janvier, février, mars 1900........	—	= 19 0/0
Avril, mai, juin 1900...............	—	= 33 0/0
Juillet, août, septembre 1900.......	—	= 50 0/0
Octobre, novembre, décembre 1900..	—	= 84 0/0
Janvier, février, mars 1901........	—	= 53 0/0
	Mortalité moyenne.	= 42 0/0

Peste bovine du buffle. — Le buffle semble être plus sensible que le bœuf à la peste bovine en Indo-Chine, contrairement à ce qui a été observé ailleurs. Les symptômes de la maladie sont les mêmes chez le buffle que chez le bœuf; ils sont seulement plus accusés. On observe en particulier, dès les premiers jours de la réaction, une rougeur intense des conjonctives, un larmoiement et un jetage plus constants.

Sur 36 buffles et bufflons que nous avons inoculés avec du sang virulent, 26 sont morts; soit une mortalité de 66 0/0. La mort survenait en général le 11e jour.

Causes de la mortalité relativement faible de la peste bovine en Indo-Chine. — La mortalité, relativement faible, causée par la peste bovine en Indo-Chine, peut être rapprochée de celle de la Russie méridionale qui serait de 30 à 40 0/0 [1].

Je pense que ce taux peu élevé de la mortalité provient de ce que la peste bovine est endémique en Indo-Chine, comme elle l'est en Russie. Il s'est formé peu à peu une race de bovins plus résistante. Nous savons, en effet, qu'un animal qui a guéri

1. Nocard et Leclainche, *Maladies microbiennes des animaux.*

de la peste est très solidement vacciné contre cette épizootie. Nous avons pu observer à Nhatrang que les veaux qui naissent de vaches vaccinées sont eux-mêmes singulièrement réfractaires au virus pestique et ne contractent tout au plus, lorsqu'ils sont infectés, qu'une maladie légère, qui vient encore renforcer leur immunité naturelle.

Il est probable que beaucoup des veaux que nous achetons aux cultivateurs indigènes pour nos expériences se trouvent dans les mêmes conditions que les veaux du laboratoire, nés de vaches vaccinées; cela suffirait à expliquer les irrégularités que nous avons observées dans la mortalité de nos animaux d'expériences.

Origine des épizooties de peste bovine en Indo-Chine. — Presque chaque année, des épizooties de peste bovine éclatent spontanément sur plusieurs points en Indo-Chine.

Nous avons remarqué que dans la vallée du Nhatrang, un village appelé Phu-Cap a été à plusieurs reprises le point de départ d'épizooties de peste. Ce village est situé à une dizaine de kilomètres du laboratoire, dont il est d'ailleurs séparé par une large rivière. Nous ne saurions donc être incriminés d'être la cause de ces épizooties périodiques.

Les indigènes ont l'habitude de réunir les animaux de plusieurs villages pour les mener paître aux champs. La maladie peut ainsi gagner de proche en proche et bientôt la région entière se trouve infectée.

A ce moment survient le marchand de bestiaux. Les indigènes se hâtent de lui vendre à vil prix les animaux qui leur restent, car une longue expérience leur a fait connaître la gravité de la peste bovine. Le marchand de bestiaux conduit par terre ses nouvelles acquisitions en Cochinchine, pour s'en défaire à des conditions avantageuses. Tout le long de la route, il sème la contagion et provoque des épizooties d'autant plus graves que les régions traversées ont été indemnes depuis plus longtemps.

Ce que j'ai dit jusqu'ici suffirait déjà à démontrer que la maladie étudiée par Carré et Fraimbault, à l'Institut Pasteur de Nhatrang, est bien la peste bovine.

Les symptômes, les lésions, la mortalité, s'ils diffèrent sur quelques points des descriptions classiques, n'en sont pas moins

assez caractéristiques pour me permettre cette affirmation.

J'ai déjà insisté sur l'importance des expériences de filtration du virus. Nous avons constaté que le virus pestique traverse les filtres poreux : le microbe de la peste bovine doit donc être rangé dans la catégorie des microbes dits invisibles ; ce n'est pas une pasteurella et la peste bovine de l'Indo-Chine ne peut plus être confondue avec la pasteurellose des bovidés.

Sérum antiseptique. — Nous préparons à Nhatrang un sérum-vaccin contre la peste bovine depuis avril 1898.

Les premières expériences ont été faites par MM. Carré et Fraimbault. Ils employaient, pour l'hyperimmunisation des animaux, des procédés semblables à ceux de M. Nicolle : les veaux à sérum n'étaient au début que des veaux guéris de la peste et dont on renforçait l'immunité au moyen d'injections de doses croissantes de sang virulent. Plus tard, nous avons préparé en une seule séance des veaux hyperimmunisés en leur injectant simultanément une dose de sérum antipestique (40 c. c.) et plusieurs litres de sang virulent.

Aujourd'hui, nous employons de préférence au sang virulent du liquide de lavage péritonéal préparé de la manière suivante :

On injecte dans la cavité péritonéale d'un veau malade (3e jour de la réaction) 8 à 10 litres d'eau salée à 8/1,000. On laisse séjourner ce liquide 3 à 6 heures dans le péritoine, puis on le retire, sans qu'il soit nécessaire pour cela de sacrifier l'animal.

Nous avons constaté, comme M. Nicolle, que l'eau salée ayant séjourné quelques heures dans la cavité péritonéale d'un veau malade s'est chargée de substances albuminoïdes et, de plus, est devenue parfaitement virulente.

Nous avons en effet réussi à donner la peste bovine à des veaux en leur injectant sous la peau 2 c. c., 1 c. c. et même 1/100 c. c. de liquide de lavage péritonéal.

Nous injectons 2 à 3 litres de liquide de lavage péritonéal à nos animaux producteurs de sérum; 15 jours après, nous commençons à les saigner. Nous pratiquons sur un même animal 4 saignées successives à 7 jours d'intervalle. Après la 4e saignée, nous injectons de nouveau 2 à 3 litres de liquide de lavage péritonéal au veau, qui, 15 jours après, sera bon à saigner.

Le sérum préparé par ce procédé nous a paru très bon à la dose de 20 c. c.

Je ne reviendrai pas ici en détail sur les nombreux essais de vaccination que nous avons pratiqués avec le sérum antipestique de Nhatrang.

Du 30 avril 1898 au 31 janvier 1901, plus de 300 essais de sérum ont été faits au laboratoire sur des animaux particulièrement sensibles. Nous avons eu une mortalité moyenne de 4 0/0 chez les vaccinés, alors que celle des témoins dépassait 40 0/0.

Ces chiffres me dispensent de tout commentaire.

Je rappellerai encore le voyage de M. Carré au Cambodge en octobre 1898, pendant lequel il eut l'occasion de pratiquer, avec un plein succès, une série de vaccinations antipestiques dans des régions désolées par la peste bovine [1].

La vaccination antipestique dans la pratique. — Comment se fait-il que, devant des résultats si encourageants, la vaccination antipestique ne soit pas mieux entrée dans la pratique?

Il y a plusieurs causes à cet état de choses.

Du côté des indigènes, nous devions nous attendre à beaucoup de méfiance en face d'un procédé nouveau. Cela n'a pas manqué, et même à Nhatrang, où nous sommes cependant installés depuis longtemps et bien connus des indigènes, nous n'étions en général avertis de l'apparition des épizooties que par hasard, et alors qu'elles avaient déjà ravagé la contrée.

Les colons européens n'auraient pas demandé mieux que de bénéficier de vaccinations ayant fait leurs preuves, mais le service des épizooties n'existait pas encore à cette époque et la difficulté des communications rendait tout secours illusoire.

Enfin, au moment où l'organisation du service des épizooties allait rendre possible l'utilisation du sérum antipestique de Nhatrang, MM. Carougeau et Blin publiaient, sous leur propre responsabilité, un mémoire dans lequel ils niaient l'existence de la peste bovine en Indo-Chine!

Quelles sont les raisons qui ont déterminé ces vétérinaires à affirmer une thèse si absolue ?

Je vais *essayer* de les exposer ici.

La peste bovine au laboratoire de Nhatrang en 1901. — De juillet à décembre 1900, une de ces épizooties spontanées et pério-

1. *Bulletin économique de l'Indo-Chine*. Année 1899, p. 248.

diques, dont nous avons parlé plus haut, ravageait la vallée de Nhatrang et les régions voisines (Ninh-Hoa, Phan-Rang.)

Grâce à des vaccinations antipestiques rapidement exécutées, nous sauvions presque entièrement nos troupeaux de réserve, qui étaient d'ailleurs en grande partie constitués par des animaux ayant guéri de la peste bovine expérimentale, ou ayant servi à des essais de sérum.

Mais cette épizootie eut, dans la suite, de graves inconvénients pour nos expériences. Nous achetons nos animaux d'expériences aux cultivateurs indigènes de la vallée de Nhatrang, ou des localités voisines. Bientôt nous constations que les veaux de passage, c'est-à-dire ceux qui nous servent à perpétuer le virus de la peste bovine au laboratoire, ne prenaient plus qu'une maladie extrêmement bénigne, ne se manifestant que par un peu d'hyperthermie du 4e au 7e jour après l'inoculation.

Je crus d'abord que ce phénomène provenait d'une atténuation de notre virus pestique et j'envoyai M. Blin à Saïgon, en mai 1901, pour ramener du virus frais à Nhatrang. Celui-ci se comporta comme notre virus ancien : les animaux inoculés ne présentaient qu'un peu d'hyperthermie du 4e au 7e jour.

Je m'explique aujourd'hui la cause réelle de cette anomalie. Elle provenait tout simplement de ce que les veaux que nous achetions pour nos expériences avaient tous une immunité naturelle plus ou moins grande, ou bien parce qu'ils avaient déjà été malades en 1900, ou bien parce qu'ils étaient nés de vaches guéries de la peste.

MM. Carougeau et Blin, ne reconnaissant pas chez les animaux inoculés les signes classiques de la peste bovine, telle qu'elle est décrite dans les ouvrages vétérinaires, crurent à l'existence d'une autre maladie et pensèrent à la *septicémie hémorrhagique* ou *pasteurellose des bovidés*.

On a donné ce nom à une maladie des bovidés causée par une bactérie ovoïde (*Pasteurella*) [1].

La septicémie hémorrhagique se présente sous plusieurs formes cliniques distinctes : forme œdémateuse, forme pneumonique, forme entérique (avec diarrhée), etc. Il y a des cas aigus et des cas chroniques. En général, on observe à l'autopsie des lésions de pneumonie, de la péricardite, de la péritonite.

1. Lignières, *Société centrale de médecine vétérinaire*, 1900.

La bactérie ovoïde (*Pasteurella*) existe dans le sang, dans les poumons, dans le péritoine. On peut la cultiver dans les milieux de culture habituels. L'inoculation du microbe aux petits animaux d'expérience tue le lapin, le cobaye, le pigeon, etc.

Si l'on injecte à des veaux des cultures pures de *pasteurella*, on peut reproduire chez ces animaux les diverses formes de la septicémie hémorrhagique avec leurs lésions caractéristiques.

On peut enfin vacciner les veaux contre la septicémie hémorrhagique en les inoculant avec des cultures atténuées de *pasteurella*. Une telle inoculation confère l'immunité contre la pasteurellose.

En résumé, la septicémie hémorrhagique ou pasteurellose des bovidés est une maladie épizootique, affectant des formes cliniques diverses, mais dans laquelle on retrouve toujours une bactérie ovoïde, visible au microscope et appartenant à la classe des *Pasteurella*.

Le virus de Phan-Rang. — En août 1901, éclatait à Phan-Rang une épizootie qui faisait de nombreuses victimes parmi les bovins de cette région. Je m'y rendis de suite pour vacciner et pour tâcher de rapporter du virus à Nhatrang.

Les veaux que nous avons inoculés dans la suite avec le virus de Phan-Rang ont pris une maladie souvent mortelle, et dont les symptômes se rapprochaient beaucoup de ceux de la peste bovine. Il y avait cependant certaines anomalies dans la marche de la maladie et dans les lésions trouvées à l'autopsie. Ainsi, l'incubation était irrégulière; quelquefois, le jour même de l'inoculation, la température dépassait 39° et se maintenait élevée. On notait cependant une nouvelle hyperthermie vers le 4e jour. Le larmoiement, le jetage, la salivation, la diarrhée étaient constants. A l'autopsie, on trouvait des lésions de pneumonie très marquées, de la pleurésie, de la péritonite fibrineuse que nous n'avions pas l'habitude de relever chez les animaux morts de peste bovine.

M. Carougeau observait de plus que des lapins, inoculés avec quelques centimètres cubes de sang virulent, prenaient régulièrement une maladie mortelle d'une durée de 9 à 12 jours [1]. A l'autopsie des lapins, on trouvait des lésions de

1. Une cause d'erreur est l'infection des cages. J'ai constaté que tout lapin, même non inoculé, placé dans des cages non désinfectées, prenait spontanément la maladie mortelle.

congestion pulmonaire, de pleurésie et de péritonite semblables à celles de nos veaux de passage. Enfin, le sang des lapins contenait en grande quantité un petit cocco bacille. Ce microbe pouvait être cultivé dans les milieux nutritifs habituels (gélose, bouillon). On arrivait à exalter sa virulence par des inoculations successives de lapin à lapin, et M. Carougeau obtenait, après quelques passages, un virus fixe tuant le lapin en trois jours.

Il restait à démontrer que l'inoculation du cocco-bacille au veau produirait chez cet animal la maladie typique observée avec le virus de Phan-Rang. M. Carougeau n'a jamais réussi à faire cette preuve. Les veaux inoculés, même avec des doses énormes de coccobacilles, succombaient quelquefois, mais sans que la maladie eût présenté en aucune façon le cycle habituel.

Enfin, jamais M. Carougeau n'a pu perpétuer son cocco-bacille par passages successifs de veau à veau.

Devant ces résultats contradictoires, il était naturel de supposer que le cocco-bacille en question n'agissait dans le virus de Phan-Rang que comme complication microbienne ; en d'autres termes, je crus entrevoir que le cocco-bacille devait être considéré, non comme la cause réelle de l'épizootie, mais comme une impureté, mélangée au virus de Phan-Rang, et dont elle modifiait l'action.

Pour m'en assurer, j'entrepris une série d'expériences dont voici le résumé :

Nous avons vu plus haut que le virus de la peste bovine ne supporte ni la dessiccation, ni l'action de la glycérine.

J'ai donc essayé de soumettre le virus de Phan-Rang à cette double épreuve.

Expérience nº 11. — Le 17 octobre 1901, je mélangeai 2 c. c. de sang virulent d'un veau de passage Phan-Rang avec 2 c. c. de glycérine. Au bout de 24 heures, le sang glycériné était inoculé à un veau (nº 1244 de nos registres) et à un lapin.

Le 23 octobre (6 jours après l'inoculation), le veau mourait sans avoir présenté d'autres symptômes qu'une température irrégulièrement élevée, dès le jour même de l'inoculation. A l'autopsie : pneumonie fibrineuse et péritonite intense avec exsudat jaune louche et fibrine.

Le sang du cœur contenait beaucoup de coccobacilles.

Le 24 octobre, le lapin mourait avec les mêmes lésions.

Expérience nº 12. — Le 23 octobre 1901, un lapin est inoculé avec 2 c. c. de sang du veau précédent. Le lapin meurt le 31 octobre (8 jours de maladie)

avec des lésions intenses de pneumonie et de péritonite. Son sang est rempli de coccobacilles.

Expérience n° 13. — 2 c. c. de sang virulent d'un veau de passage de Phan-Rang sont mis à dessécher dans le vide. Au bout de 48 heures, la dessiccation est complète. Le résidu sec est alors dilué dans 2 c. c. d'eau distillée et on l'inocule à un veau (n° 1245 de nos registres) et à un lapin.

Le veau contracte une maladie grave, caractérisée par une hyperthermie irrégulière et de la diarrhée. Il finit par guérir.

Le lapin meurt le 12e jour avec de la pneumonie et de la péritonite.

Expérience n° 14. — Un petit veau recoit dans la veine 5 c. c. de sang d'un lapin mort de coccobacillose. Le 6e jour, le veau meurt après n'avoir présenté aucune hyperthermie. A l'autopsie : pneumonie et péritonite.

Ces diverses expériences démontrent que le virus de Phan-Rang n'était pas un virus pur de peste bovine, car nous savons :

1° Que celui-ci ne tue pas le lapin ;

2° Qu'il est rapidement détruit soit par l'action de la glycérine, soit par la dessiccation.

Il est intéressant de constater que le sérum antipestique préparé avec le virus de Phan-Rang n'a donné que de mauvais résultats : les veaux vaccinés et éprouvés avec le même virus contractaient une maladie presque aussi grave que les témoins.

Il est à noter d'autre part que notre sérum antiseptique était absolument sans action sur la maladie du lapin :

Expérience n° 15. — Un lapin reçoit sous la peau 2 c. c. de sérum antiseptique et 1 c. c. de sang d'un veau de passage (virus de Than-Rang). L'animal meurt, le 7e jour en même temps qu'un lapin témoin.

M. Carougeau a essayé d'immuniser une vache contre le cocco-bacille. Cette expérience n'a eu aucun succès :

Expérience n° 16. — Une vache reçoit sous la peau un tube de culture sur gélose du cocco-bacille Carougeau-Blin. Elle présente de l'hyperthermie le jour même et le lendemain, puis la température redevient normale.

Au bout de 8 jours, on la réinocule avec la même dose d'une culture de même origine : réaction identique accompagnée d'un peu de diarrhée sanguinolente ; l'animal maigrit.

15 jours plus tard, on opère une 3e injection, toujours avec un tube de culture sur gélose du cocco-bacille Carougeau-Blin. La vache a, le soir même, 40° de température ; ses selles sont dysentériques et sanguinolentes. La réaction dure 30 heures environ et, par suite, l'animal maigrit de nouveau considérablement.

La vaccination paraît impossible et les inoculations sont suspendues.

Un mois plus tard, la vache est inoculée avec du barbone; elle meurt en moins de 24 heures.

Cette expérience démontre que le cocco bacille Carougeau-Blin ne peut même pas être identifié avec la Pasteurella de Lignières. Nous savons en effet que la vaccination contre la Pasteurella est facile. MM. Carougeau et Blin n'ont jamais réussi à vacciner contre leur cocco-bacille.

MM. Carougeau et Blin ont déduit de cette série de faits, un peu confus, que « la maladie désignée en Indo-Chine sous le nom de peste bovine n'est qu'une septicémie hémorrhagique du groupe des pasteurelloses ». Voici les arguments principaux qu'ils donnent pour appuyer cette thèse[1] :

1. *La maladie est inoculable au lapin.* — Nous venons de voir que cela n'a été démontré que pour le virus de Phan-Rang, qui doit être considéré comme douteux et impur.

2. *La cohabitation est un mode peu sûr de contagion.* — C'est tout à fait inexact. MM. Carré et Fraimbault considéraient plutôt, et avec de nombreuses expériences à l'appui, ce mode d'infection comme le plus certain.

3. *La gravité de l'affection consécutive à l'injection de sang virulent dépend de la quantité de virus injecté; il faut donner 20 c. c. de sang pour être sûr d'infecter un animal.* — Nous avons vu que, tout au contraire, il semblerait que la maladie est d'autant plus grave que la quantité de sang virulent injectée est moins forte.

4. *L'hyperthermie s'accuse du 2e au 6e jour.* — Cela n'est vrai qu'avec le virus impur de Phan-Rang, ou lorsqu'il s'agit du barbone, maladie dont nous nous occuperons plus loin.

5. *Le virus perd sa virulence par des passages successifs. Certaines séries mettent 6 mois à s'éteindre, d'autres 2 mois.* — Nous avons vu plus haut que notre première série de passages était aussi active après 3 ans qu'au premier jour, et que, si elle s'est éteinte, c'est parce que nous n'avions plus à notre disposition, comme animaux d'expérience, en 1901, que des veaux réfractaires à la peste.

1. La pasteurellose bovine en Indo-Chine, prétendue peste bovine par Carougeau et Blin. (*Bulletin de la Société centrale de médecine vétérinaire*, 13 février 1903).

6. *Dans la peste bovine, il y a toujours des lésions intenses, et constamment au niveau des muqueuses un processus d'inflammation très vive accompagné d'exsudations croupales et d'ulcérations.* — Nous avons vu que cette lésion, fréquente peut-être en Europe, n'a été observée ni par M. Koch au Transvaal, ni par M. Nicolle à Constantinople.

En définitive, il nous paraît évident que, sous le nom de *septicémie hémorrhagique*, MM. Carougeau et Blin ont confondu deux épizooties distinctes l'une de l'autre : la *peste bovine* et le *barbone.*

La base de leur argumentation est un cas particulier, celui du *virus de Phan-Rang.* Ce cas, fort intéressant d'ailleurs, ne doit pas être fréquent, car, malgré toutes nos recherches, nous n'avons pu en retrouver d'analogues depuis plus d'une année.

III

LE BARBONE

Voici, d'après Nocard et Leclainche[1], les signes principaux du barbone :

Le barbone est une maladie contagieuse des buffles et des bœufs, se traduisant par des symptômes fébriles aigus et par des engorgements œdémateux en diverses régions.

Le barbone est dû à un microbe de la classe des coccobacilles : il se présente sous la forme d'une bactérie presque ronde, à pôles plus colorés, avec un espace central difficile à percevoir. La coloration est obtenue avec les couleurs d'aniline; la bactérie se décolore par le procédé de Gram.

Les cultures s'opèrent dans le bouillon, sur gélatine, et surtout sur agar glycériné.

L'inoculation tue le buffle, le bœuf, le cheval, le porc, le lapin, le cobaye, le rat, la souris, le pigeon, etc.

Symptômes. — Le buffle ou le bœuf atteint se sépare du troupeau et cesse de manger et de ruminer. Il grince des dents, a la tête basse, le regard fixe et immobile. La température oscille entre 40° et 42°. La respiration est accélérée et pénible, les muqueuses sont congestionnées.

Chez un certain nombre de malades, apparaît dans la région

1. Nocard et Leclainche, *Maladies microbiennes des animaux.*

de la gorge une tumeur dure, chaude, douloureuse. La respiration est gênée, un jetage muqueux, jaunâtre, s'écoule des narines.

Ces symptômes ont une évolution très rapide ; l'animal tombe sur le sol et meurt avec des crampes et des convulsions.

La durée moyenne de l'évolution est de 12 à 24 heures ; les animaux résistent rarement pendant 2 à 3 jours ; tout à fait exceptionnellement pendant 6 à 8 jours.

Le taux de la mortalité varie entre 70 et 96 0/0.

Lésions. — A l'autopsie, on constate de la péritonite fibrineuse, une tuméfaction des ganglions. Le foie et les reins sont congestionnés ; la rate est normale. Les voies respiratoires sont très congestionnées ; les poumons sont engorgés de sang et œdématiés.

Les microbes spécifiques sont rencontrés en abondance dans les exsudations et dans le sang.

Présence du barbone en Indo-Chine. — En juillet 1901, M. Schein était envoyé à Saïgon pour pratiquer des vaccinations contre une épizootie qui sévissait alors en Cochinchine. Au cours de sa tournée, à Tay-Ninh, M. Schein remarqua que l'épizootie se manifestait avec un caractère tout particulier. Les animaux frappés mouraient en un temps extrêmement court et présentaient presque toujours une tumeur œdémateuse dans la région du cou. M. Schein pensa de suite au barbone. Il envoya à Nhatrang du sang pris sur un animal mort. Nous avons pu facilement confirmer son diagnostic, et dès lors, nous avons étudié au laboratoire le barbone en même temps que la peste bovine.

MM. Carougeau et Blin [1] ont essayé d'hyperimmuniser des chevaux contre le barbone. Cette opération est délicate, car le cheval est extrêmement sensible au barbone. Des injections répétées de cultures du microbe font maigrir considérablement les chevaux et les affaiblissent beaucoup.

MM. Carougeau et Blin ont cependant réussi à obtenir en petite quantité du sérum de cheval immunisé. Ce sérum a été employé pour quelques essais de vaccination du veau et du buffle. Pour que ces vaccinations réussisent à coup sûr, il est préférable de mélanger à une dose suffisante de sérum (20 c. c.

1. *Bulletin économique de l'Indo-Chine.* Janvier 1903.

par exemple) une petite quantité de virus actif de barbone (2 c. c. de culture en bouillon peptonisé).

Il convient d'ajouter ici que l'immunité conférée par cette vaccination n'est que relative : son efficacité et sa durée ne sont pas comparables à celles de la vaccination antipestique.

Après le départ de M. Carougeau, M. Schein a repris les expériences de vaccination contre le barbone. Il a renoncé au cheval, comme sujet producteur de sérum, à cause de l'impossibilité de maintenir cet animal en bon état. La sensibilité du cheval au barbone est telle que, même en espaçant les injections et en les réduisant à de très petites doses, le cheval maigrit au point d'être rapidement inutilisable.

Le bœuf ne présente pas ces inconvénients ; en agissant avec prudence, on arrive à obtenir en deux mois des animaux hyperimmunisés, nullement amaigris, et donnant un sérum efficace à la dose de 20 c. c.

Fréquence du barbone en Indo-Chine. — Le barbone est-il aussi répandu en Indo-Chine que la peste bovine?

Je ne le crois pas ; je ne pense pas notamment que les épizooties de barbone prennent l'extension considérable que l'on observe dans les épizooties de peste bovine.

Certaines observations et des expériences de laboratoire nous laissent croire que le simple contact d'un animal malade avec un animal sain est insuffisant pour causer l'infection. Nous avons observé à plus d'une reprise des cas de barbone isolés au milieu de troupeaux nombreux. — Nous avons pu mettre en contact intime des animaux malades avec des animaux sains, sans parvenir à contaminer ces derniers.

Peut-être est-il nécessaire que le virus soit inoculé par l'intermédiaire de certains insectes : moustiques, taons; ou bien les animaux s'infectent peut-être aussi en broutant des plantes épineuses souillées par les déjections d'un animal malade?

Cette question importante est encore à l'étude et sera l'objet d'un prochain mémoire.

Diagnostic différentiel entre la peste bovine et le barbone. — Lorsque le barbone se manifeste à l'état aigu, le diagnostic n'est pas difficile : la tumeur œdémateuse au cou, la marche rapide de la maladie permettent d'établir sans hésitation le diagnostic.

Il y a cependant des cas de barbone qui sont moins aisés à

reconnaître. On a observé des épizooties dans lesquelles la mort ne survient qu'après 8 ou 10 jours et où les symptômes sont à peu près les mêmes que ceux de la peste bovine : larmoiement, jetage, salivation, diarrhée. Les lésions à l'autopsie n'ont rien de caractéristique, comme nous l'avons déjà vu.

M. Schein a observé une épizootie semblable à Tientsin en novembre 1900. Il croyait avoir affaire à la peste bovine et avait pratiqué des injections de sérum antipestique; elles furent sans aucun effet. L'épizootie était due, non à la peste bovine, mais au barbone ; aussi tous les animaux vaccinés moururent lorsqu'on les inocula avec du sang virulent.

Nous connaissons heureusement un procédé simple qui permet de faire un diagnostic certain et rapide dans les cas douteux. Le lapin, qui est complètement réfractaire à la peste bovine, est, au contraire, extrêmement sensible au barbone : des doses infimes de virus barboneux tuent cet animal en moins de 24 heures.

Dans les épizooties douteuses, on pourra utiliser cette sensibilité toute spéciale des lapins et les inoculer pour assurer le diagnostic.

La peste bovine ne vaccine pas plus contre le barbone que le barbone ne vaccine contre la peste bovine. — MM. Carougeau et Blin ont émis l'idée que le barbone n'est autre chose que la septicémie hémorrhagique (ou pasteurellose bovine) à l'état aigu, tandis que la prétendue peste bovine représenterait la forme chronique de cette maladie.

Ce que nous avons dit plus haut suffirait à réfuter l'opinion de MM. Carougeau et Blin. Nous pouvons encore fournir d'autres arguments d'un ordre différent :

Si le barbone et la peste bovine étaient deux manifestations d'un seul et même virus, il est probable que l'une de ces formes vaccinerait contre l'autre; en d'autres termes, la peste bovine (pasteurellose bovine chronique de MM. Carougeau et Blin) devrait vacciner les animaux contre le barbone (pasteurellose aiguë des mêmes auteurs).

Il n'en est rien, et nous avons de nombreuses expériences qui prouvent qu'un animal rendu réfractaire à la peste bovine par vaccination prendra le barbone mortel aussi facilement qu'un animal neuf.

De même, les animaux vaccinés contre le barbone ne se sont nullement montrés réfractaires à la peste bovine, qui a évolué chez eux avec la même gravité que chez les témoins.

L'expérience n° 16, relatée plus haut, est un nouvel argument en faveur de ma thèse : une vache inoculée à plusieurs reprises avec des cultures de coccobacille Carougeau-Blin, non seulement n'a pas résisté à une inoculation de barbone virulent, mais même n'a présenté aucune tolérance contre le coccobacille, malgré des injections répétées de ce microbe.

Cette expérience nous démontre que le coccobacille Carougeau-Blin qui, suivant ces vétérinaires, était la cause unique de la peste bovine et du barbone, n'a aucune relation avec ces deux maladies.

IV

LE CHARBON

On distingue deux maladies charbonneuses que l'on désigne sous les noms de *charbon bactéridien* et de *charbon symptomatique.*

La présence du charbon symptomatique n'a pas encore été démontrée scientifiquement en Indo-Chine; il nous est permis de supposer, jusqu'à preuve du contraire, que les rares cas de charbon symptomatique signalés jusqu'ici n'étaient que du barbone.

Le charbon bactéridien est caractérisé par le développement, dans le sang et les organes des animaux atteints, d'une bactérie spéciale appelée *bactéridie charbonneuse.* Les moutons sont surtout susceptibles de prendre cette maladie. Les bovidés et les chevaux paraissent être beaucoup moins sensibles.

En 1897, M. Fraimbault a pu constater près de Nhatrang quelques cas de charbon bactéridien. Ces cas s'étaient produits dans un troupeau de bœufs appartenant à des cultivateurs indigènes. Ils sont restés isolés et n'ont jamais pris une allure épidémique. Quelques chevaux du laboratoire sont morts du charbon pour avoir pâturé avec le troupeau de bœufs contaminés. Ces chevaux étaient d'ailleurs des animaux affaiblis par des injections répétées de cultures de peste humaine, donc ils se trouvaient dans un état de réceptivité tout spécial.

Nous n'avons jamais entendu parler, depuis cette époque, de cas de charbon dans la vallée de Nhatrang.

En juin 1902, Blin a constaté la présence de quelques cas isolés de charbon dans la province de Thay-Nguyen et dans le Yen Thé, au Tonkin [1]. Des vaccinations charbonneuses ont été dès lors pratiquées en grand dans la région par le service des épizooties : plus de 10.000 vaccinations auraient été pratiquées en 1903.

Nous avons fait à Nhatrang une série de recherches pour déterminer la sensibilité des bovins de l'Indo-Chine au charbon et nous sommes arrivés à cette conclusion singulière que, même en employant des cultures très virulentes, il est extrêmement difficile de donner expérimentalement la maladie charbonneuse mortelle aux bovins.

D'un autre côté, les semences de vaccins charbonneux que nous avons fait venir de Paris, sur la demande du chef du service des épizooties, sont arrivées trop atténuées pour pouvoir être utilisées; et nous avons assisté, en 1903, au singulier spectacle de 10.000 vaccinations charbonneuses faites par le service des épizooties avec de la bactéridie virulente, sans aucun accident [2].

Ces résultats, fort intéressants d'ailleurs, me portent à croire que l'on s'est peut-être exagéré l'importance du charbon en Indo-Chine. La maladie y existe, cela n'est pas douteux; d'autre part, n'est-il pas à craindre qu'en lui attribuant une importance non justifiée, on ne risque de négliger d'autres épizooties plus redoutables, et qu'on n'ait, un jour, la désagréable surprise de voir les troupeaux vaccinés contre le charbon, décimés par la peste bovine ou le barbone.

V

ÉPIZOOTIES DIVERSES

Surra. — M. Carougeau a étudié en 1902 une maladie des chevaux assez répandue dans certaines régions de l'Indo-Chine et qui se rapproche beaucoup du *Surra* des Indes anglaises.

Dans le sang des animaux atteints, on trouve en grande

1. *Bulletin économique de l'Indo-Chine.* Notes sur des vaccinations charbonneuses, août 1902.

2. *Bulletin économique de l'Indo-Chine.* Rapport sur le charbon bactéridien au Tonkin par Lepinte, Douarche et Bauche.

quantité un protozoaire de la classe des trypanosomes. La maladie dure un mois environ et se termine toujours par la mort. Les symptômes principaux sont de la fièvre, de l'œdème du ventre, une anémie et un amaigrissement profonds.

Nous ne connaissons aucun remède contre le surra.

Fièvre aphteuse. — Cette épizootie existe en Indo-Chine, où elle détermine une mortalité considérable.

Nous avons été, en 1898, visités à Nhatrang par la fièvre aphteuse. La complication dite des « onglons » est très fréquente : par suite des lésions des pieds, les animaux ne peuvent plus se tenir debout; le décubitus prolongé entraîne des troubles de l'appareil digestif, qui peuvent amener la mort.

Tétanos. — Nous avons observé le tétanos chez nos chevaux, à la suite d'injections sous-cutanées, suivies d'abcès, et plus souvent chez les bovidés blessés par le tigre. Nous avons réussi à supprimer complètement cette grave complication en pratiquant, chaque fois que cela paraissait indiqué, des injections de sérum antitétanique aux animaux.

Maladies encore inconnues. — Il y a toute probabilité pour qu'il y ait en Indo-Chine d'autres maladies contagieuses des animaux encore ignorées par nous.

Je rappellerai l'histoire du virus de Phan-Rang, qui reste peu claire.

Tous les propriétaires de troupeaux de bovins ont pu observer, parmi leurs animaux des cas mortels isolés ressemblant à la peste bovine par les symptômes, mais n'en ayant pas la contagiosité. S'agit-il de peste bovine, de barbone, à l'état sporadique ou d'une autre maladie? Nous n'en savons rien.

Beaucoup de points restent encore obscurs dans nos connaissances sur les épizooties de l'Indo-Chine. Il appartient à l'Institut de Nhatrang de faire les recherches nécessaires pour compléter nos connaissances à ce sujet. Le passé, les traditions de ce laboratoire, ses relations intimes avec l'Institut Pasteur de Paris, l'ont préparé à cette tâche.

Je souhaite que, dès que le personnel du laboratoire sera suffisamment nombreux, un de nos bactériologistes puisse constamment être envoyé en mission partout où sévira une épizootie. Nous pourrons ainsi contrôler nos expériences anciennes et acquérir des connaissances nouvelles.

VI

CONCLUSIONS

Nous croyons avoir démontré dans ce mémoire les faits suivants :

1. La peste bovine existe en Indo-Chine à l'état endémique; cette épizootie est la cause principale de la mortalité des bovidés.

2. On a confondu sous le nom de *septicémie hémorrhagique* deux maladies absolument distinctes : la *peste bovine* et le *barbone*.

3. Le barbone et le charbon bactéridien ne paraissent pas avoir l'importance et l'extension de la peste bovine en Indo-Chine.

Il me semble résulter de ces constatations que la loi sanitaire de 1881 ne saurait être appliquée dans toute sa rigueur en Indo-Chine.

Cette loi visait, en ce qui concerne la peste bovine, une maladie étrangère au territoire français, importée accidentellement, et dont le législateur a voulu débarrasser à tout prix le pays; de là les mesures draconiennes prises contre la peste bovine en France, telles que l'abatage en masse des troupeaux atteints et les indemnités payées aux propriétaires (*pour les animaux abattus seulement*).

La situation se présente en Indo-Chine sous un tout autre aspect : la peste bovine est endémique; nous ignorons encore la façon dont les épizooties locales prennent naissance; donc, d'ici longtemps, nous ne pouvons songer à débarrasser définitivement l'Indo-Chide de ce fléau.

Il y aurait lieu, me semble-t-il, de modifier la loi sanitaire de 1881 pour l'Indo-Chine en ce qu'elle a de trop rigoureux, et de la compléter par des mesures résultant de nos connaissances nouvelles.

L'abatage des troupeaux contaminés me paraît être une mesure excessive et inutile ; il y a dans les troupeaux infectés une certaine proportion d'animaux qui résistent; ces animaux ont acquis l'immunité contre la peste bovine, leur destruction serait donc à tous points de vue regrettable.

Il est à souhaiter que les vaccinations antipestiques soient placées au premier rang des mesures nouvelles à prendre. Ces

vaccinations ont fait leurs preuves; elles doivent aujourd'hui entrer dans la pratique [1].

J'estime que les colons et les propriétaires de bestiaux devront compter plus sur eux-mêmes, pour assurer cette vaccination, que sur le service des épizooties.

Je n'entends par là faire aucune critique désobligeante de ce service ; mais quels que soient le zèle et le dévouement des vétérinaires inspecteurs des épizooties, ces fonctionnaires trop peu nombreux, mal secondés par un personnel indigène sans instruction pratique, risquent le plus souvent d'arriver trop tard et de se trouver désarmés devant l'extension du mal. Nous savons en effet que la mortalité atteint rapidement des proportions énormes dans les troupeaux atteints de peste bovine. La difficulté des communications fera perdre un temps précieux, pendant lequel presque tous les animaux du troupeau infecté seront contaminés et voués à la mort.

Il serait donc utile que dans chaque province, chez chaque colon même, au besoin, il y eût des dépôts de sérum antipestique qui permettraient de parer aux premiers besoins.

Alors pourrait intervenir utilement le vétérinaire, ou au besoin des vaccinateurs indigènes bien dressés, qui, s'il était nécessaire, pourraient préparer sur place, d'après nos méthodes et au moyen des animaux du troupeau infecté, un supplément de sérum. La vaccination des bestiaux de toute la région serait ainsi assurée à peu de frais.

Nous avons salué avec joie la création toute récente d'une société d'assurance mutuelle agricole, dirigée par M. Fort. Cette société a plus d'intérêt que qui que ce soit à combattre la mortalité des bestiaux. Nous avons constaté déjà l'initiative hardie, du Directeur de la société, qui a bien voulu envoyer à Nhatrang un certain nombre d'indigènes tonkinois dans le but d'en faire des vaccinateurs praticiens des épizooties pour les troupeaux assurés.

Il est évident que la vaccination des troupeaux infectés ne devra pas empêcher les services des épizooties de prendre des mesures d'isolement et de désinfection, dont personne ne contestera la nécessité.

1. L'Institut Pasteur de Nhatrang est aujourd'hui en mesure de préparer 2,000 doses de sérum antipestique par mois.

Nous pouvons espérer que si chacun contribue pour sa part à combattre le mal : l'Institut de Nhatrang en préparant les serums et en continuant ses études ; les colons et la Mutuelle agricole en assurant la vaccinations des troupeaux; le Service des épizooties en prenant part à ces vaccinations et en assurant les mesures générales d'isolement et de désinfection, nous verrons peu à peu décroître la mortalité des bestiaux, pour le plus grand avantage de tous et pour la prospérité de l'agriculture et de l'élevage en Indo-Chine.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DU TÉTANOS DIT MÉDICAL OU SPONTANÉ

INFLUENCE DE LA CHALEUR

Par M. H. VINCENT

Médecin-major de 1re classe, Professeur au Val-de-Grâce.

(Travail du Laboratoire de Bactériologie du Val-de-Grâce.)

I

Les recherches expérimentales qui ont été entreprises par M. Vaillard et nous-même, en vue d'élucider la pathogénie du tétanos, ont démontré que le microbe de cette maladie est inapte à végéter dans l'organisme vivant, s'il n'est secondé par diverses influences favorisantes telles que : associations bactériennes, action de poisons chimiques ou microbiens, altération mécanique des tissus, hémorragie, etc. Ces conditions annihilent ou retardent l'immigration phagocytaire et la réaction cellulaire défensive au foyer infecté. Elles permettent la multiplication locale, si restreinte qu'elle soit, du bacille de Nicolaier, et telle est l'activité de la toxine tétanique, que la quantité impondérable qui en est secrétée en ce point, suffit à empoisonner le système nerveux et à déterminer la mort.

Il y a, peut-être, lieu de se demander si toutes les circonstances adjuvantes qui régissent l'infection tétanique, nous sont bien connues et si, à côté des précédentes qui sont d'importance capitale, il n'en est pas d'autres capables, à leur tour, d'exercer le même rôle. L'histoire médicale du tétanos renferme, en effet, un grand nombre de faits d'observation dont l'étiologie est demeurée très obscure. Aucun traumatisme, aucune plaie, n'ont paru présider au développement de la maladie : de là, le nom de *tétanos idiopathique, essentiel, spontané,* etc., donné improprement à cette variété de l'affection.

Or, la spontanéité du tétanos ne saurait être admise aujour-

d'hui. L'éclosion de cette maladie exige, d'une part, la pénétration évidente ou cryptogénétique du bacille — d'habitude sous sa forme sporulée — et, d'autre part, la fructification de ce microbe sous l'influence de quelque cause seconde ou favorisante.

De ce que l'une ou l'autre de ces causes adjuvantes, mais indispensables, nous échappent parfois, il serait imprudent de conclure qu'elles n'existent pas et que le tétanos *dit* idiopathique se réclame d'une pathogénie différente.

Pour éclaircir les conditions qui président à l'apparition de cette variété clinique du tétanos, on ne peut tirer profit des cas observés chez l'homme. L'examen attentif du malade, la recherche du foyer initial de culture du bacille demeurent presque toujours infructueux. Chez un homme atteint de tétanos primitif, que j'ai observé en 1892, et qui succomba à la forme suraiguë de cette affection, l'enquête aussi bien que l'examen bactériologique sont restés sans résultat.

Le seul renseignement important qui me fut donné, c'est que cet homme avait fait, 6 ou 7 jours avant le début de son tétanos, une marche en plein soleil et par une forte chaleur. A son retour, il avait eu de la fièvre, de l'insomnie, une céphalée violente, en un mot, tous les symptômes d'une insolation.

Examiné avec soin, ce malade ne présentait que quelques traces cicatrisées d'excoriations insignifiantes. La voie de pénétration du bacille, comme il arrive si souvent, est demeurée inconnue.

Quelle avait été la cause favorisante de l'infection ? Fallait-il incriminer le coup de chaleur et l'élévation thermique qu'il détermine ? La pathologie humaine ne permettait pas d'approfondir aisément ce problème : il pouvait y avoir quelque intérêt à en aborder l'étude au point de vue expérimental. Tel est l'objet de ce travail.

II

De nombreuses observations ont démontré l'influence pernicieuse que possède la chaleur sur l'apparition, chez l'homme, de certaines infections telles que la fièvre typhoïde, et sur la gravité particulière que ce facteur imprime à la maladie.

Expérimentalement, la grenouille, réfractaire au charbon, le

gros lézard, indifférent à l'inoculation du bacille de la tuberculose aviaire, succombent aux progrès de ces infections si on les fait vivre dans une atmosphère de 25 à 30°.

Lannelongue, Achard et Gaillard ont constaté que l'exposition à l'étuve accélère l'évolution de la tuberculose chez les lapins inoculés avec le bacille de Koch.

L'infection tétanique de la grenouille peut être rendue possible par une cause semblable.

L'insolation, la chaleur provoquent, en effet, chez les animaux, des phénomènes pathologiques qui rappellent entièrement ceux que l'on observe chez l'homme.

Un chien, un lapin, un cobaye, immobilisés et exposés à l'action directe des rayons du soleil, ne tardent pas à présenter une augmentation progressive de leur température propre. Ils meurent en 3 ou 4 heures, dans le coma, après avoir manifesté une dyspnée intense, de l'agitation, des convulsions.

Leur température agonique atteint 43°, 44° et davantage.

On peut aussi facilement observer les mêmes symptômes en mettant l'animal dans une étuve dont la température n'a pas besoin d'être très élevée (38 à 42°)[1].

Si l'on veut étudier certaines des conséquences qui résultent ultérieurement de cet échauffement artificiel, il faut arrêter l'expérience au moment où la température des animaux atteint 42°,5; au delà de ce chiffre, les animaux meurent, tantôt en 24 heures, tantôt au bout de quelques jours, et dans un état cachectique.

Nos expériences ont été pratiquées sur le cobaye, le lapin, le rat blanc et la souris. L'animal de choix pour cette étude est le cobaye. Le lapin n'est pas favorable parce qu'il est beaucoup moins sensible au tétanos et que, ainsi qu'on le montrera dans des recherches prochaines, beaucoup de conditions favorisantes de l'infection tétanique, très puissantes chez les autres animaux, restent sans effet sur lui.

On prend un cobaye vigoureux et on lui injecte, sous la peau, un cinquième de c. c. de culture tétanique sporulée, débarrassée de sa toxine par le chauffage à 85° pendant 3 heures. On place

1. H. Vincent, *Recherches expérimentales sur l'Hyperthermie*. Paris, O. Doin, 1887.

ensuite cet animal dans l'étuve à 40°; sa température est prise toutes les demi-heures.

Un cobaye témoin ayant reçu la même dose de culture, est laissé dans sa cage.

Lorsque la température du premier cobaye a atteint 42° à 42°,5, l'animal est retiré de l'étuve. On constate qu'il n'est nullement affaissé; son état paraît normal. L'hyperthermie décroît en 1 heure à 3 heures.

Or, tandis que chez le cobaye témoin on n'observe pas de tétanos, au contraire, chez le cobaye surchauffé apparaissent, après 2 ou 3 jours, les premiers signes de tétanos. D'ordinaire il s'agit d'une pleurosthotonos qui cède la place, au bout de 3 ou 4 heures, parfois avant, à une raideur généralisée. A partir de ce moment, les symptômes sont symétriques et la marche du tétanos est suraiguë, *presque foudroyante*. Certains animaux ont eu un tétanos généralisé d'emblée, et telle est la rapidité de l'intoxication, que l'un est mort 11 heures, l'autre 9 heures après le début des accidents.

La symptomatologie de ces cas mérite d'être relevée, car elle est assez spéciale. L'animal atteint est agité d'un tremblement généralisé vibratoire. Lorsqu'on le saisit et qu'on le laisse retomber sur ses pattes, il rebondit. Tantôt alors il réussit à marcher les membres raides et écartés, la tête relevée, tantôt il est pris de crises convulsives toniques avec tremblement, suivies d'une période d'asphyxie et d'inertie complète. La mort arrive dans l'une de ces crises. La température de l'animal est abaissée ; elle est, en moyenne, de 36°.

L'élévation thermique accélère également la marche du tétanos déjà déclaré. Lorsqu'on soumet un cobaye atteint de tétanos léger, à évolution chronique et curable, à l'action de l'étuve jusqu'à ce que sa température atteigne 42°, la marche du tétanos s'en trouve brusquement aggravée, et l'animal meurt en 12 heures à 24 heures.

On peut constater, en résumé, que l'ensemble des symptômes offerts par les animaux inoculés avec le tétanos et soumis aussitôt après à l'action de la chaleur, se rapproche singulièrement de ceux que l'on observe dans le tétanos splanchnique dont Binot a donné la description[1].

1. J. Binot, Etude expérimentale sur le tétanos, *Th. de Pzris*, 1899.

Le fait paraîtra d'autant plus remarquable que les cobayes chez lesquels j'ai fait ces expériences ont toujours reçu la culture sous la peau. Il est donc à présumer déjà que l'hyperthermie réalise des conditions d'infection analogues à celle du tétanos splanchnique, c'est-à-dire une infection viscérale. C'est un point sur lequel je vais revenir bientôt.

Le tétanos aigu et généralisé n'exige pas, pour se produire, que l'inoculation ait été faite en même temps que la mise à l'étuve. Le résultat est aussi marqué si l'inoculation a été faite 1, 2, 3, 4 jours auparavant. Toutefois, si l'on attend davantage, la marche du tétanos se ressent de la durée de l'intervalle qui sépare la date de l'infection tétanique de celle de l'hyperthermie expérimentale. Plus cette période est brève, plus le tétanos est aigu. Plus elle est prolongée, plus les symptômes de toxi-infection s'atténuent. La durée de l'aptitude à l'infectiosité peut parfois, quoique exceptionnellement, se prolonger, chez le cobaye, pendant 30, 40, 60 jours. En d'autres termes, le bacille tétanique, inséré à l'état sporulé sous la peau du cobaye, peut se conserver, à l'état de microbisme latent, pendant les périodes indiquées. Chez un cobaye, le tétanos est apparu au 5e jour et a été mortel, bien que l'injection des spores ait été faite 48 jours auparavant. Un cobaye chauffé a présenté un peu de raideur tétanique 60 jours après l'injection des spores sans toxine, 9 jours après avoir été mis ensuite à l'étuve.

Ces faits sont évidemment applicables à la pathologie humaine et ils permettent d'expliquer qu'on ne puisse si souvent découvrir la porte d'entrée du bacille par une plaie, depuis longtemps cicatrisée.

Il importe, cependant, de faire remarquer que si la période de vie latente des spores peut être très prolongée, elle est très variable aussi suivant l'animal. Certains cobayes inoculés 30 et même 15 jours auparavant, et soumis à l'action de l'étuve ou à celle du soleil, n'ont pas présenté le plus léger signe de tétanos. D'autres n'ont eu qu'une raideur minime et éphémère.

Quelle que soit l'acuité des symptômes et celle de leur marche, parfois foudroyante, il existe toujours une phase d'incubation de 2 à 3 jours, en moyenne. Même dans les cas où l'animal va être emporté en quelques heures, il reste, en appa-

rence, très bien portant pendant la période prététanique. Cette incubation, à peu près fixe dans les formes graves, plus prolongée dans les formes subaiguës ou chroniques du tétanos expérimental, correspond au temps nécessaire pour que le bacille ait eu le temps de se multiplier et de sécréter sa toxine.

L'*autopsie* des animaux ayant succombé à la forme suraiguë, ne montre aucune lésion locale. Les viscères sont normaux. Cependant le foie a paru plus friable. La rate n'est pas tuméfiée. Le sang est normal; l'examen microscopique y montre de très rares leucocytes, presque tous appartenant aux polynucléaires pseudo-éosinophiles.

Le système nerveux paraît sain.

Si les lésions d'autopsie sont, comme d'ordinaire, peu appréciables, *l'examen bactériologique* a, par contre, révélé des faits dignes d'être notés.

Dans les cas de tétanos ordinaire, d'origine traumatique, même dans ceux qui ont entraîné la mort à brève échéance, les prélèvements ne fournissent le bacille de Nicolaier qu'au seul point inoculé. Même lorsqu'on ensemence de grandes quantités de sang, de foie, de rate, etc., le milieu nutritif reste stérile. Ce n'est qu'exceptionnellement qu'un ensemencement copieux de tissu cérébral (presque tout le cerveau) a pu donner lieu à une culture[1].

Le tétanos est, en effet, le type des infections locales.

Ainsi qu'on vient de le voir, la végétation bactérienne paraît être beaucoup plus diffuse chez les animaux dont on a élevé artificiellement la température pendant quelques heures. L'influence de la chaleur et l'hyperthermie peuvent modifier entièrement les conditions pathogéniques habituelles du tétanos et créer un état de réceptivité tel que *le bacille se généralise dans toute l'économie de l'animal infecté.*

Chez les cobayes ayant, en effet, succombé à la forme suraiguë du tétanos, tous les tissus (rate, foie, moelle osseuse, tissu nerveux) ensemencés en très petite quantité, ont régulièrement donné, par la culture, le bacille de Nicolaier. Le sang

1. L. Vaillard et H. Vincent, Contribution à l'étude du tétanos, *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 janvier 1891.

lui-même, ensemencé à la dose de une à quatre gouttes, a fourni des cultures positives. Les frottis de rate et surtout de foie ont montré, à l'examen microscopique, des bacilles très nets.

Il semble donc résulter de ces recherches que, parmi les diverses conditions qui favorisent le développement du tétanos, il n'en est pas de plus énergiques que la chaleur.

L'élévation de la température agit-elle sur le microbe pour lui communiquer une virulence particulière, ou bien sur l'organisme inoculé dont elle atténuerait le degré de résistance?

La première hypothèse paraît bien peu vraisemblable, non seulement parce que l'hyperthermie des animaux n'est que de courte durée, mais encore, et surtout, parce qu'il n'est pas habituel qu'un microbe pathogène voie grandir son activité lorsqu'il est cultivé à une température élevée telle que 42°. J'ai, du reste, essayé de cultiver le bacille à cette température : la culture a été à peu près nulle.

On est donc autorisé à conclure que la fièvre expérimentale et la chaleur exercent leurs effets, non sur le microbe pathogène, mais sur l'organisme, non sur la graine, mais sur le terrain. Elle annihile à un tel degré les forces de résistance de l'individu, qu'une maladie d'intoxication, telle que le tétanos, à foyer d'évolution exclusivement local, peut devenir une maladie générale, une sorte de *septicémie tétanique*.

De là les caractères cliniques de l'affection qui rappellent ceux du tétanos splanchnique. De là, encore, l'acuité extraordinaire des symptômes observés. Présent dans tous les viscères et le système nerveux, le bacille du tétanos déverse simultanément dans tout l'organisme une abondante quantité de toxine qui foudroie l'animal parfois en quelques heures, ainsi qu'on l'a vu.

On a signalé parfois, dans quelques maladies d'intoxication telles que la diphtérie, la diffusion du microbe dans les viscères. Cette généralisation est toujours favorisée par quelque cause adjuvante telle que les associations microbiennes. Mais jamais pareille constatation n'avait été faite pour le tétanos. L'hyperthermie a donc la propriété de transformer, en quelque sorte, l'animal en un milieu inerte où le bacille de Nicolaier, d'ordi-

naire si peu adapté à la végétation *in vivo*, peut se multiplier sans rencontrer de résistance. Il nous faut, en conséquence, essayer d'étudier le mécanisme intime qui préside à cette réceptivité si particulière et qui détermine un état infectieux si anormal.

III

Dans les recherches que nous avons faites, M. Vaillard et moi [1], touchant la pathogénie de l'infection tétanique, nous avons montré quelle part considérable revient au processus leucocytaire dans la défense de l'organisme contre les spores tétaniques. Ces spores, débarrassées de leur toxine par le chauffage et insérées sous la peau, sont très rapidement englobées par un grand nombre de cellules polynucléaires; certaines de ces cellules renferment jusqu'à 30 spores. Après six heures, il ne reste presque plus de spores libres. Beaucoup d'entre elles, attaquées par les sucs cellulaires, ont diminué de volume, restent pâles et se colorent peu ou point par la méthode de Ziehl. Après 18 à 24 heures, il devient impossible de retrouver les spores au point lésé.

La phagocytose exerce, en effet, un rôle capital dans la protection contre le microbe du tétanos. Immobilisées ou, en partie, digérées par les phagocytes, ces spores ont perdu momentanément leur aptitude à se développer et à cultiver dans l'organisme.

Il est donc vraisemblable que, dans les expériences mentionnées ci-dessus, la chaleur à laquelle sont soumis les animaux doit avoir pour effet de neutraliser les forces vives défensives de l'organisme et de paralyser l'influence protectrice des phagocytes.

En vue de vérifier l'exactitude de cette proposition, j'ai recherché quels sont les effets déterminés par la chaleur sur les leucocytes, dans le sang des animaux.

A cet effet, un certain nombre de cobayes sains, n'ayant pas mangé depuis 24 heures, afin d'éviter l'influence de la leucocytose alimentaire, ont été mis dans l'étuve à 40°.

Leur température était fréquemment prise. A chaque éléva-

1. Vaillard et Vincent, *loc. cit.*

tion notable de celle-ci, on pratiquait la numération des leucocytes, leur détermination qualitative et l'étude de leurs altéra-

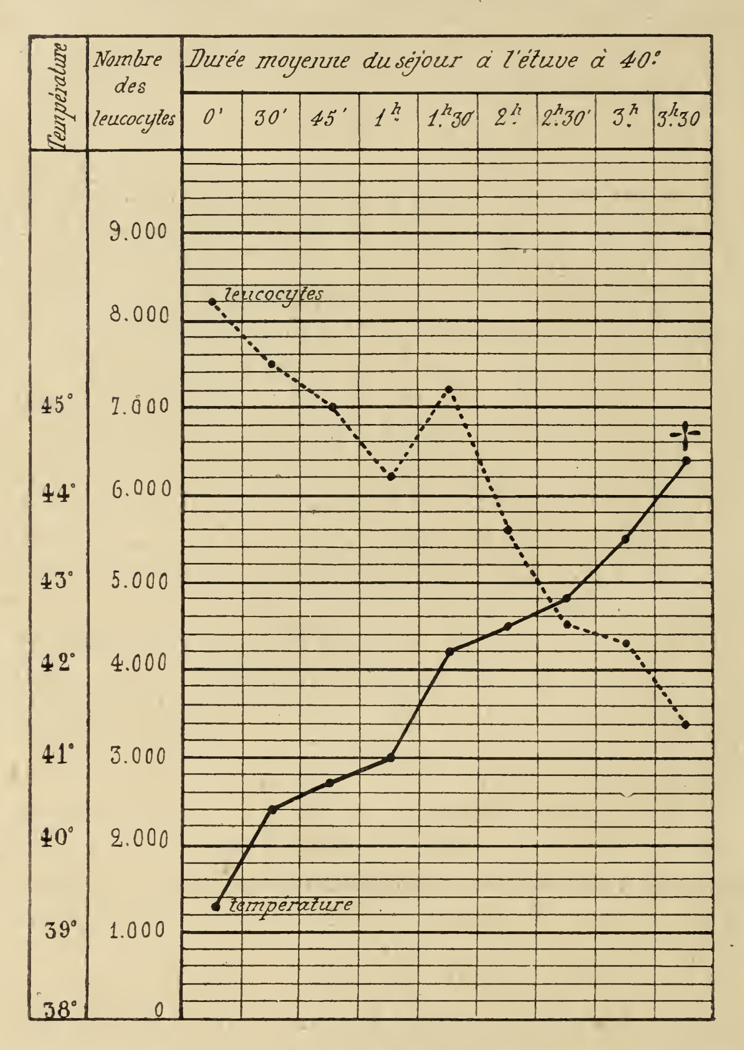


Fig. 1 — Modifications de l'équilibre leucocytaire chez les animaux soumis à la chaleur (Hypoleucocytose thermique).

tions histologiques, s'il s'en présentait. Cette recherche a été faite un grand nombre de fois, soit chez le lapin, soit chez le cobaye. Elle a donné, d'ailleurs, chez l'un et l'autre, des résultats semblables

On observe, chez les animaux ainsi surchauffés, des modifications quantitatives et qualitatives des cellules blanches du sang.

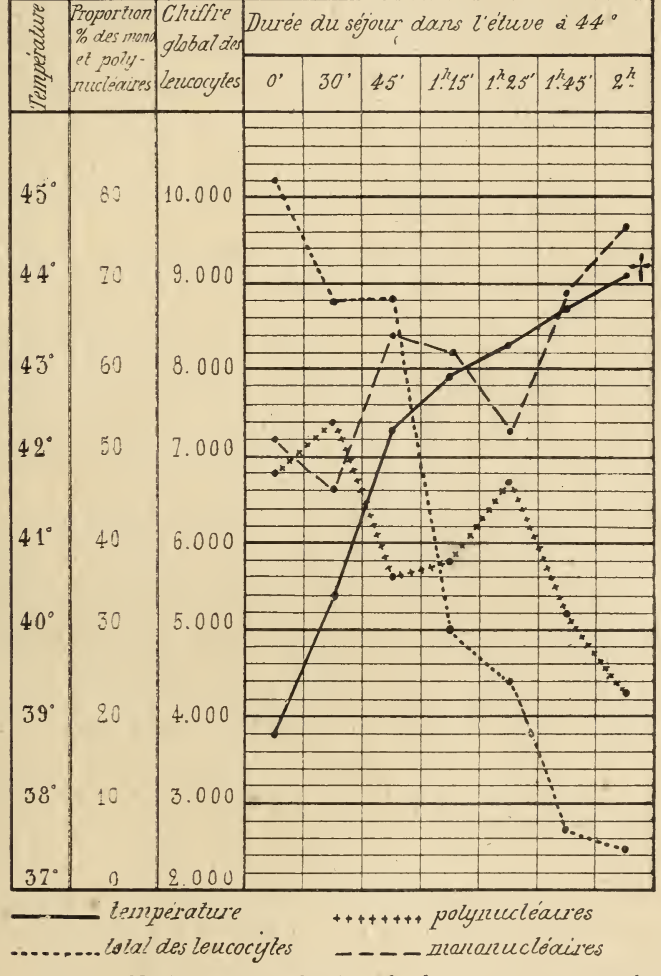


Fig. 2 — Modifications qualitatives des leucocytes mono et polynucléaires en fonction de la température de l'animal. (Hypopolynucléose.)

1° *Modifications numériques des leucocytes.* — Le fait dominant, c'est la diminution progressive du nombre des leucocytes contenus dans le sang, à mesure que la T propre des animaux s'élève. Il y a eu, constamment, relation inverse entre le degré

thermique et la proportion numérique des leucocytes du sang.

Le graphique ci-joint reproduit la moyenne des numérations leucocytaires chez 3 cobayes, pris au hasard, avec indication corrélative de la T de l'animal (*fig. 1*).

Le chiffre des leucocytes s'abaisse dès le début de l'expérience, et dès que la T. de l'animal commence à s'élever. La diminution est progressive. Toutefois, lorsque la T de l'animal atteint le voisinage de 42°, il existe presque toujours une élévation fugace du taux des leucocytes qui tend à ramener leur nombre auprès de la normale (*Voir la figure 1*). Cette réaction est parfois très accentuée. Si l'animal est retiré de l'étuve à ce moment, il se rétablit presque aussitôt et le nombre de ses leucocytes se relève au bout de 4 à 8 heures, dépassant même le chiffre initial.

S'il est laissé à l'étuve, le nombre des leucocytes décroît ensuite régulièrement. Au moment de la mort, il n'est pas rare de trouver, au lieu de 8,000 à 10.000 leucocytes, chiffre de l'état normal, 3,000 et même 2,000 leucocytes. Un de ces animaux en présentait 1,820 seulement[1].

2° *Modifications qualitatives des éléments leucocytaires.* — Il existe, chez les animaux surchauffés, des différences assez notables, d'un animal à l'autre, dans la composition des éléments leucocytaires du sang. Chez les uns, et c'est le plus grand nombre, la diminution des leucocytes a porté plus spécialement sur les cellules polynucléaires. Chez les autres, elle s'est effectuée surtout aux dépens des éléments mononucléaires. Ces différences ont paru être en rapport avec le degré et la durée de la résistance des animaux à l'influence de la chaleur. Les animaux qui résistent peu à l'action de l'étuve, et chez lesquels les symptômes de torpeur sont précoces, montrent surtout une diminution des polynucléaires, alors que les lymphocytes ne paraissent subir qu'une faible modification proportionnelle de leur nombre : ce sont ces animaux qui présentent plus tard la forme foudroyante du tétanos. Au contraire, chez les cobayes qui ont résisté plus énergiquement et plus longtemps, et chez lesquels la mort a été plus lente, le taux de la mononucléose a été trouvé abaissé et les polynucléaires ont été, par rapport

1. Il serait intéressant d'étudier ces modifications leucocytaires quantitatives et qualitatives, chez l'homme atteint d'insolation ou de coup de chaleur.

aux mononucléaires, plus nombreux qu'à l'état normal. Il ne s'agit, bien entendu, que d'une augmentation *relative* de ces derniers, puisque le chiffre global des leucocytes décroît toujours dans l'hyperthermie (*fig. 2*).

J'ai signalé précédemment une augmentation momentanée dans la proportion totale des leucocytes au moment où la T de l'animal atteint 42° environ. Ce relèvement du nombre des leucocytes est dû à l'augmentation de toutes les variétés de leucocytes, lymphocytes et polynucléaires pseudo-éosinophiles. Il traduit bien certainement une réaction défensive. L'augmentation des polynucléaires ne coïncide pas toujours avec celle des lymphocytes.

Quelles que soient les variations observées dans l'équilibre leucocytaire, il est deux sortes d'éléments qui disparaissent à peu près entièrement : ce sont les grandes cellules mononucléaires et les éosinophiles. Pendant la première partie de l'expérience, c'est-à-dire jusqu'au moment de l'augmentation critique du chiffre des leucocytes, leur nombre, qui n'est jamais bien élevé, reste stationnaire. Pendant la seconde partie, le chiffre des grands mononucléaires diminue avec rapidité; les cellules éosinophiles (1 à 1,5 0/0) disparaissent d'une manière semblable.

3° *Altérations histologiques des leucocytes.* — Que deviennent les cellules lymphatiques ayant ainsi disparu du sang? Sont-elles emmagasinées dans les viscères ou les organes lymphoïdes? Sont-elles détruites? Il semble que cette dernière hypothèse soit la plus acceptable. Le sang du cœur ponctionné pendant la vie ou aussitôt après la mort, manifeste la même hypoleucocytose que le sang des vaisseaux périphériques. D'autre part, on peut observer des lésions assez prononcées des leucocytes.

Dès que la température de l'animal a dépassé 42°,5, on assiste à la cytolyse des leucocytes qui débute par le gonflement du plasma et du noyau des grands mononucléaires et des polynucléaires. Plus tard, le noyau de ces cellules est disloqué, diffusé; sa chromatine s'est dissoute partiellement ou morcelée dans le protoplasma de la cellule. Il devient, dès lors, difficile de reconnaître la nature des cellules ainsi altérées.

Dans les cellules éosinophiles, les globules de même nature

sont, en partie, fusionnés, effacés, irréguliers. Quelques-uns sont incolores et paraissent comme vidés.

Les globules sanguins n'ont jamais montré de lésions.

En résumé, chez les animaux surchauffés et dès que leur température atteint 42°,5 à 43°, on constate une leucolyse qui porte plus spécialement sur les cellules phagocytaires : cellules polynucléaires et grands mononucléaires, microphages et macrophages.

Le déficit leucocytaire et la diminution des phagocytes peuvent donner l'explication de la défaillance de l'organisme en face de l'invasion microbienne. Désorganisées ou surprises par l'hyperthermie, les cellules polynucléaires, qui entrent particulièrement en jeu dans l'absorption et la digestion des spores tétaniques, abandonnent ces dernières et la pullulation du microbe dans tous les points de l'organisme devient ainsi possible[1].

La cytolyse des cellules sporifères livre l'organisme sans défense à l'invasion du bacille du tétanos. Délivrées de l'obstacle qui les immobilisait, les spores ne tardent pas à germer silencieusement jusqu'au moment où leurs sécrétions viennent imprégner le système nerveux. La dissémination des spores dans tous les tissus et tous les viscères, dans le sang lui-même (bien que les spores n'y puissent germer en raison de la présence de l'oxygène), explique à la fois la rapidité foudroyante des symptômes tétaniques et leur généralisation d'emblée, enfin les caractères séméiologiques de l'affection, absolument analogues à ceux du tétanos splanchnique.

IV

Il y a lieu, maintenant, de se demander si les conclusions qui découlent de ces recherches expérimentales ne sont pas également applicables à l'homme. La chaleur, l'insolation, sont-elles susceptibles de favoriser l'infection tétanique chez l'homme, au même titre que chez certains animaux, tels que le cobaye ? Question d'un certain intérêt car, s'il en est ainsi, nous connaissons l'une des causes qui peuvent déterminer le tétanos dit idiopathi-

1. C'est certainement la même cause qui permet d'expliquer la présence des bactéries venues de l'intestin dans tous les viscères des animaux, pendant la période agonique. De là, aussi, la putréfaction précoce de leurs cadavres.

que, et il sera possible d'en prévenir les effets si redoutables.

Or, il paraît hors de doute que l'influence prolongée de la chaleur, celle du soleil, de ses radiations calorifiques et chimiques, interviennent dans la pathogénie de certains cas de tétanos, chez l'homme. L'histoire médicale du tétanos fournit, en effet, à cet égard, des renseignements de grande valeur. Les climats chauds et tropicaux sont signalés depuis longtemps comme particulièrement féconds en cas de tétanos. Heyfelder, Morehead, Bajon, F. Raymond, Emery-Desbrousses, L. Vincent et Burot, etc., ont mentionné cette fréquence anormale du tétanos à la Guyane, dans les Indes, en Afrique, notamment à Madagascar, etc... C'est surtout en été qu'on l'y observe. Le « tétanos des pays chauds », comme il a été appelé, est non seulement plus commun, mais encore plus rapidement mortel que dans les pays tempérés.

« Dans les pays chauds, dit Burot, le tétanos revêt une forme presque foudroyante, puisqu'il tue ordinairement en moins de 24 heures [1] ».

Pendant les guerres, Larrey, Thierry ont signalé la coïncidence de chaleurs très fortes avec les épidémies de tétanos. « En Espagne, dit Fournier-Pescay, plusieurs fois après avoir fait route pendant toute une journée, par l'ardeur d'un soleil brûlant, sur un sol incandescent... plusieurs de nos hommes étaient pris, le lendemain, de tétanos *universel* [2]. »

D'autres auteurs ont aussi décrit des exemples de tétanos consécutif à une insolation. J. More a publié le cas d'un agriculteur ayant travaillé dans les champs, au mois de juillet, par une chaleur intense. Il eut, à la suite, une prostration profonde et un grave malaise. Peu de jours après, il offrait les premiers signes d'un tétanos mortel. Il n'avait eu aucune plaie, aucune piqûre [3].

J. Benton a rapporté un cas qui se rapproche du précédent [4].

Chez le malade que j'ai moi-même observé, et dont j'ai fait mention au début de ce travail, je n'ai pu découvrir d'autre cause favorisante de son tétanos qu'un coup de chaleur.

Il suffira, sans nul doute, que l'attention soit appelée sur la complicité possible de cette cause adjuvante, pour qu'un certain

1. Burot, *Bulletin de l'Académie de médecine*, 2 février 1897, p. 126.
2. Cité par Chaillous. *Thèse de Paris*, 1899.
3. J. More, Tetanus following sunstroke, *The Lancet*, 16 septembre 1876, p. 395.
4. Benton, A case of idiopathic tetanus, *Ibid.*, 11 novembre 1896, p. 682.

nombre d'autres cas de tétanos, en apparence spontanés, puissent désormais lui être rattachés.

En tout état de cause, il paraît utile d'injecter préventivement du sérum antitétanique aux sujets exposés à une insolation ou à un coup de chaleur, lorsque ces malades ont eu antérieurement des plaies ou des traumatismes ouverts qui aient pu donner passage au bacille de Nicolaier. C'est surtout dans les pays chauds que cette mesure prophylactique pourra rendre de grands services.

ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Des lésions syphilitiques observées chez les singes anthropoïdes

Par ARNAL et PAUL SALMON

Avec la planche IV.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

Cette étude constitue une annexe au mémoire de MM. Metchnikoff et Roux paru dans ces *Annales* en décembre 1903 sous le titre : *Études expérimentales sur la syphilis*.

Nous avons eu comme matériaux d'études : 1° un chancre induré et des syphilides secondaires, provenant d'un chimpanzé femelle; — 2° un chancre induré pris sur un chimpanzé mâle.

II

Le chancre du chimpanzé femelle datait de 79 jours — Siégeant sur le prépuce clitoridien et en contact avec le sol souillé d'impureté; il présentait les signes d'une infection secondaire surajoutée. A la surface, l'épiderme a disparu par places, remplacé par un tissu conjonctif cicatriciel, formé de faisceaux parallèles enfermant des cellules conjonctives, des cellules mononucléaires à noyau rond, et tout près de la superficie des polynucléaires

En résumé, la lésion n'est pas nettement spécifique. C'est un chancre en voie de guérison, et infecté secondairement.

III

Au moment de la mort de l'animal, en même temps que le chancre de la vulve existaient sur divers points de la peau des papules, syphilides secondaires datant de 49 jours au plus. Au niveau de ces lésions, la couche épithéliale est très amincie. Au-dessous, le tissu cellulaire est parsemé de cellules

rondes, mononucléaires, à noyau peu coloré ; l'inflammation semble en voie de régression, prouvée par la prolifération du tissu conjonctif et la rareté relative des mononucléaires dans la région immédiatement sous-épithéliale. A la partie profonde du derme, les petits vaisseaux sont entourés de ces cellules mononucléaires, abondantes. On ne voit pas de cellules géantes, mais des mastzellen. On peut admettre que les syphilides sont en voie d'effacement, de disparition.

IV

Plus importantes et plus caractéristiques sont les observations faites sur le chancre de la cuisse du chimpanzé mâle. Il s'agissait d'un ulcère primitif de 45 jours, en voie de guérison. L'épiderme est conservé sans solution de continuité. Il est très aminci au centre de la lésion et hypertrophié sur les côtés. Dans le tissu dermique s'enfoncent des bourgeons malpighiens avec nombreuses ramifications ; ces bourgeons épidermiques sont rétrécis à leur partie superficielle et comme étranglés.

Le tissu cellulaire du derme a disparu, transformé en œdème séreux, contenant un réseau de fibrine, et une très grande quantité de cellules rondes inflammatoires. L'infiltration s'étend presque jusqu'à la couche cellulo-graisseuse profonde. Sur les bords, elle diffuse sans limites bien précises. Les cellules rondes ont un gros noyau arrondi périphérique, plus ou moins clair, entouré d'un protoplasme coloré de façon uniforme, sans granulations ; certains éléments correspondent aux plasmazellen de Unna. Ils se montrent surtout groupés au voisinage ou autour des vaisseaux sanguins, et principalement des artérioles ; ils sont disposés en cercles concentriques autour des tuniques du vaisseau.

Les glandes sudoripares ne sont pas accompagnées de cellules inflammatoires.

Dans la partie superficielle du derme, les capillaires sanguins apparaissent très dilatés, remplis d'hématies et de globules blancs abondants (leucocytose locale). En un point, une artériole rompue a donné naissance à une infiltration hémorrhagique.

Enfin, dans le tissu cellulaire sous-cutané, une veine se

montre atteinte d'endophlébite ; l'épaisseur de la tunique interne est très augmentée et l'endothélium proliféré obture presque la lumière du vaisseau.

Dans la zone inflammatoire, on voit des cellules pigmentophages, remplies du même pigment que l'on retrouve à la base de l'épiderme. dans quelques cellules épithéliales. La syphilis, chez le singe encore plus que chez l'homme, laisse à sa suite une cicatrice brune, pigmentée.

En résumé, on n'observe dans ce chancre du chimpanzé mâle, ni cellules géantes ni polynucléaires, mais presque uniquement des plasmazellen. Ce fait, la présence des mononucléaires, la mononucléose, est une des caractéristiques de la lésion syphilitique. Les lésions de périartérite ont une valeur pathogénique analogue. Il est donc permis de rapprocher, d'identifier le chancre syphilitique du chimpanzé et le chancre syphilitique de l'homme, puisque l'on retrouve dans les deux cas le même aspect histologique et la même réaction inflammatoire.

M. Darier, dont on connaît la compétence, a bien voulu examiner ces coupes et confirmer le diagnostic histologique de chancre syphilitique du chimpanzé mâle.

Et comme ce chancre du chimpanzé mâle est une lésion de passage, provenant d'un premier chimpanzé femelle, il est logique d'admettre que les deux animaux ont été atteints de syphilis.

EXPLICATION DE LA PLANCHE IV

FIG. I — Coupe d'un chancre de la cuisse (chimpanzé mâle).

a, a'). — Bourgeons épithéliaux s'enfonçant dans le derme.

b, b'). — Infiltration du derme.

c) . — Foyer inflammatoire périvasculaire.

d) . — Foyer d'apoplexie hémorrhagique.

e) . — Région sous-cutanée dans laquelle on voit un vaisseau à parois épaissies.

FIG. II. — Montre un foyer périvasculaire dans lequel on reconnaît de grandes cellules mononucléaires dites « Plasmazellen ».

FIG. III. — Cellules « Mastzellen » dans la paroi externe d'une petite artère.

b). Nombreuses cellules « Mastzellen » disséminées autour du vaisseau.

FIG. IV. — Vaisseau montrant une prolifération intense des cellules endothéliales oblitérant presque complètement sa lumière.

La Résorption de l'acide urique et de l'urate de soude

Par le Dr J.-J. VAN LOGHEM (d'Amsterdam).

Dans un mémoire, publié par les *Archives de Virchow*, Rindfleisch[1] a décrit des préparations microscopiques, provenant d'un tophus, extirpé chez lui-même. Ce savant observait une phagocytose des cristaux du tophus, — fait intéressant, qui lui permettait d'expliquer la modification de la grandeur que le tophus avait subie *durante vita*.

M. Metchnikoff a bien voulu me charger d'examiner cette question de plus près.

En commençant l'étude de ce sujet, il m'est apparu que le phénomène observé par Rindfleisch — et avant lui par Rielh[2] — n'a pas seulement l'importance d'un simple fait biologique ; mais que, pour bien le comprendre, il fallait entrer dans les questions spéciales de la pathologie de la goutte.

C'est pour cela qu'il faut les résumer en quelques mots.

L'étude de la goutte n'est pas assez avancée pour qu'il soit permis de parler d'une maladie expérimentale; les notions sur les causes et les conditions de cette maladie sont tellement vagues qu'il est impossible d'amener l'organisme normal jusqu'à l'état goutteux. Toutefois la méthode expérimentale a aussi sa place dans ce chapitre spécial de pathologie, puisque la chimie et la morphologie ont démontré le rôle de l'acide urique dans la goutte.

Dans l'histoire de la goutte, la période expérimentale commence avec les travaux d'Ebstein[3]. Ce savant considère l'acide urique comme *materia peccans*, opinion déjà exprimée par

1. E. Rindfleisch, *Ueber Bildung und Rückbildung gichtischer tophi. Virchow's Archiv*, Band 171, H. 3, 1903.

2. G. Riehl, *Zur Anatomie der Gicht*, *Wiener Klinische Wochenschrift*, 26 Aug. 1897, p. 761.

3. W. Ebstein, *Gicht Deutsche Klinik des*, 19, J. h. III, 25-26, pag. 130, 1901. *Die Natur und Behandlung der Gicht*. Wiesbaden. 1882.

Garrod[1]; d'après Ebstein, l'acide urique est une *substance toxique* qui cause des modifications inflammatoires et nécrosantes des tissus, lesquelles finissent par la nécrose complète; dans le tissu *mort,* l'acide urique est précipité sous la forme d'urate de soude. La présence de l'acide urique dans les tissus en quantité anormale est due à une « stase »; le plus souvent cette stase est localisée (goutte articulaire primaire); en d'autres cas, elle est généralisée et dépend d'une lésion rénale (goutte rénale primaire).

Pour fonder cette théorie, qui est admise à présent par un grand nombre de pathologistes, Ebstein a fait deux séries d'expériences.

D'abord, pour savoir si la stase de l'acide urique aboutit à une modification des tissus, comparable à celle qu'on trouve dans la goutte, il a pratiqué la ligature des uretères chez des oiseaux. C'est l'expérience classique de Galvani, qui, destinée à résoudre une question de morphologie, fut appliquée à la physiologie et à la pathologie. Déjà Galvani avait signalé en passant *alba terrestris materia :* une précipitation d'urate de soude dans les tissus d'animaux morts à la suite de ces ligatures; Ebstein examine de plus près ces produits de la stase expérimentale et les compare aux précipitations d'urates dans le corps des goutteux.

Les résultats de ses expériences confirment absolument sa conviction, acquise pendant ses études anatomiques; *il a réussi à reproduire chez la poule des altérations qui, au point de vue anatomique, sont équivalentes à celles observées chez l'homme, au cours de l'arthrite uratique* [2].

Dans la seconde série de ses expériences faites pour prouver l'action nuisible de l'acide urique sur les tissus, Ebstein n'eut pas tant de succès.

Ni l'injection dans la cavité abdominale, ni celles dans la chambre antérieure de l'œil, les reins et le cartilage de l'oreille n'ont été répétées. La disparition de dépôts artificiels d'acide urique dans la cornée ne fut même pas étudiée microscopiquement. La seule expérience regardée comme décisive est celle de l'injection dans la cornée, d'acide urique dissous dans

1. A. B. Garrod, *A Treatise on Gout and Rheumatic Gout*, 3e édition, London, 1876.
2. W. Ebstein, *Die Natur,* etc., p. 71.

une solution de phosphate de soude. L'auteur pouvait constater *die toxische Wirkung*, (l'action toxique) de l'acide urique, par la présence de leukomes dans la cornée. (P. 81).

Mais *des dépôts cristallins d'urates ont été rarement observés ainsi que les nécroses* (p. 82).

Les recherches anatomiques et expérimentales d'Ebstein ont été vivement critiquées. Riehl[1], Aschoff, Duckuorth Dyce et récemment Krause[2] trouvaient souvent chez des goutteux du *tissu normal,* contenant des cristaux d'urate de soude; selon eux la thèse que la nécrose précède la précipitation des urates ne serait pas soutenable.

Ebstein ne nie pas le fait, observé par ces auteurs, mais l'explique comme phénomène postmortel[3].

C'est Likhatscheff[4], qui attaque la doctrine d'Ebstein au moyen d'expériences; il répète la ligature des uretères et formule une conclusion qui diffère considérablement de celle d'Ebstein. D'abord, Likhatscheff remarque que les dépôts d'urates, dans le corps de la poule morte, se trouvent surtout dans les organes internes, riches en sang, tandis que la formation des tophus du malade goutteux a lieu le plus souvent dans les petites articulations et dans les parties du corps mal nourries par le sang; ensuite il a observé plusieurs fois des cristaux dans du tissu qui n'avait subi aucune modification visible.

Aussi la seconde série d'expériences d'Ebstein — sur l'influence nuisible de l'acide urique sur le tissu de la cornée du lapin — était attaquée. Leber[5], dans son travail complet sur l'inflammation, ne peut pas admettre une action nocive intense de l'acide urique; les cristaux introduits dans la cornée et dans la chambre antérieure de l'œil disparaissent très vite et sans réaction considérable.

Tandis qu'Ebstein visait le centre même de la question, d'autres, tels qu'Ilis et Freudweiler, Pfeiffer, etc., ont préféré l'aborder par la périphérie.

1. Riehl, *l. c.*
2. K. A. Krause, *Zur Kenntniss der Uratablagerungen im Gewebl, Zeitschr. Klin Medicin,* Band 50, I, II, p. 136.
3. Ebstein, *Deutsche Klinik, l. c.*, p. 139.
4. Likhatscheff, *Experimentelle Untersuchungen über die Folgen der Ureteren-Unterbindung bei Hühnern, Ziegler's Beiträge.* Band XX, 1896, p. 102.
5. Th. Leber, *Die Entstehung des Entzündung.* Leipzig, 1891, p. 254.

Dans un travail très étendu, Freudweiler[1] a suivi le sort de cristaux d'*urate de soude* introduits sous la peau des lapins; il a vu que ces cristaux sont englobés par des cellules du tissu conjonctif, par des leucocytes et des cellules géantes. (Nous avons retrouvé dans nos préparations tout ce que Metchnikoff a décrit au sujet de la phagocytose dans les tissus.)

His[2] a complété ces expériences en injectant les mêmes cristaux dans la cavité abdominale et les articulations de lapins et de cobayes; les dépôts ainsi obtenus disparaissent par le même processus que les cristaux sous-cutanés.

Dans un second mémoire[3], Freudweiler donne ses recherches sur la genèse du tophus goutteux; les résultats de ce travail sont négatifs. L'auteur admet une augmentation de l'acide urique dans les humeurs des tissus du malade goutteux comme condition indispensable de la précipitation des urates, mais il n'a pas réussi à trouver les causes locales qui déterminent la cristallisation; je reviendrai plus tard sur ce travail.

En résumé, les résultats des études expérimentales sur la goutte sont plutôt maigres. La théorie d'Ebstein ne trouve qu'un faible appui dans les expériences de son fondateur; les recherches de His et Freudweiler donnent bien une idée sur la façon dont les tophus disparaissent, mais ne nous font pas savoir comment ils se forment.

EXPÉRIENCES SUR LA RÉSORPTION DE L'URATE DE SOUDE ET DE L'ACIDE URIQUE

J'ai commencé par répéter quelques-unes des expériences de Freudweiler et His. En injectant sous la peau de lapins de l'eau physiologique contenant une quantité de 0,1-0,5 grammes d'urate de soude, j'obtenais des dépôts sous-cutanés de ce sel; déjà, après quelques heures, le gonflement local provoqué par l'injection subit une diminution considérable (résorption de l'eau physiologique) et il en reste un « tophus artificiel » : une petite

1. M. Freudweiler, *Ueber das Wesen der Gichtknoten, Deutsches Archiv. fur Klinische Médixin.* Band 63, p. 266, 1899.

2. His, *Schicksal und Wirkung der s. hams. Natrons im Bauch und Gelenkhöhle des Kaninchens, Ibid,* Band 67, p. 81.

3. Freudweiler. *Ueber die Entstehung der Gichtrnoten, Ibid,* Band 69. p. 155.

tumeur sous-cutanée, dure, dans la région de laquelle la peau devient rouge et chaude.

Après quelque temps le dépôt est sensiblement diminué, et il finit même par disparaître tout à fait.

En examinant des tophus de différents âges, — après fixations et durcissement par l'alcool absolu, inclusion dans la paraffine et coloration par la safranine, la thionine ou le brun de Bismarck, — on peut confirmer les observations de Freudweiler qui ont montré que les cristaux disparaissent par phagocytose.

Après la description détaillée de Freudweiler, il me semble inutile d'insister sur ce procès; j'attirerai l'attention seulement sur un petit fait.

Dans les coupes d'un dépôt qui date d'un mois (expér. 18) on trouve quelques *rosaces* d'aiguilles ; il est clair qu'il ne s'agit pas ici des cristaux injectés, mais d'une *reprécipitation* d'urate de soude qui avait été dissous. De quelle manière cette dissolution s'est-elle faite? Par les humeurs des tissus? Cela semble peu probable parce que les humeurs vivantes ne montrent guère d'action sur l'urate de soude (v. ci-dessous les expériences aux sacs de collodion). De même, on doit exclure la possibilité d'une précipitation *post mortem*, parce que quelques-unes des rosaces sont déjà englobées par des cellules géantes; la seule explication plausible est que la dissolution de l'urate de soude s'est faite par digestion intracellulaire et que la réprécipitation s'est produite après la mort de la cellule.

Une autre série d'expériences, faites avec l'*acide urique*, — pour le comparer avec l'urate de soude, — donnait un *résultat surprenant qui s'oppose absolument aux observations de Freudweiler.*

Freudweiler[1] a injecté des cristaux d'acide urique sous la peau de lapins; il appelle ces injections « *lediglich Vorversuche* » (essais préliminaires), pour établir l'action de cette substance sur le tissu vivant; il examine au microscope des dépôts de 0, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24 heures et de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 18, 20, 21, 28, 35, 50 jours.

Il a observé *que l'acide urique détermine une nécrose complète des tissus là où il est amassé. Les masses cristallines sont transportées par les phagocytes à partir du troisième jour* (p. 164-165).

1. Freudweiler, second mémoire déjà cité.

Les préparations provenant de mes expériences montrent tout autre chose. Déjà après 24 heures, une partie considérable de la masse des cristaux d'acide urique a disparu; un noyau seulement des cristaux injectés est resté sur place.

A la périphérie du dépôt, dont les limites primitives sont bien marquées par les leucocytes, et parmi les cristaux d'acide urique, on trouve des *rosaces régulières* d'aiguilles, de véritables soleils, qui diffèrent absolument des cristaux larges et isolés, qui avaient été injectés[1].

Ces rosaces sont entourées par des leucocytes.

La nature de cette reprécipitation est facile à établir; les aiguilles en soleils disparaissent vite par la formaline et par l'acide acétique; avec ce dernier réactif on obtient après la dissolution une précipitation des cristaux rhomboïdes bien connus de l'acide urique.

Ces réactions microchimiques, combinées à la morphologie des cristaux, et les conditions sous lesquelles la précipitation s'est faite, montrent nettement que nous avons observé *une précipitation d'urate de soude dans un tissu baigné par un liquide contenant de l'acide urique en quantite considérable.*

On ne peut pas méconnaître que le phénomène décrit ci-dessus soit identique à la genèse du tophus; il est nécessaire d'examiner ce fait nouveau de plus près.

1. *La précipitation d'urate de soude après injection de cristaux d'acide urique est-elle constante?*

Sept dépôts de cristaux d'acide urique sous la peau dorsale de trois lapins (expér. 5, 1, 4, 3, 2, 6, 9) furent examinés après 1, 4 1/2, 24, 3 × 24 et 4 × 24 heures, après 14 jours et après 1 mois.

Dans une des préparations faite seulement après 4 heures 1/2, je trouvai déjà à sa limite, une *rosace d'urate de soude*, selon toute apparence encore intacte.

Après 24 heures, la couche périphérique des cristaux injectés a disparu, elle est remplacée par des leucocytes, de la fibrine et des rosaces d'urate de soude.

1. Il semble étonnant que M. Freudweiler ait examiné les préparations de 22 dépôts sans s'apercevoir que les masses des cristaux qu'il avait sous les yeux n'étaient pas de la même nature que celles qu'il avait injectées.

Probablement cet expérimentateur a employé des cristaux du commerce qui, étant tassés ou agglomérés, avaient perdu leur aspect caractéristique.

Les autres dépôts montraient les mêmes modifications, en rapport avec leur âge et la quantité d'acide urique injectée.

2. *La modification des tissus par le traumatisme de l'injection joue-t-elle un rôle?*

Pour cela, je modifiai les conditions locales en injectant dans *la cavité abdominale* de lapins et de cobayes.

En ouvrant la cavité abdominale d'un lapin (expér. 52) 1 heure après l'injection intrapéritonéale de cristaux d'acide urique en suspension dans de l'eau physiologique, on retrouve une partie considérable de ces cristaux encore libres dans la cavité, mais agglomérés en petites masses blanches par la fibrine; par-ci par-là, l'une d'elles est légèrement adhérente à l'épiploon, au mésentère ou à la paroi de l'intestin; en faisant des coupes à paraffine, on observe que les cristaux sont réunis et entourés par de la fibrine, dans laquelle se trouvent des leucocytes.

Si on ouvre après 17 heures la cavité abdominale d'un lapin traité de la même manière (expér. 35) et si on étale, sous le microscope, une partie de l'épiploon ou du mésentère colorée par le brun de Bismarck, on voit que ces masses de cristaux d'acide urique sont transformées en rosaces, c'est-à-dire en urate de soude. Cette transformation se fait voir encore plus nettement dans les coupes d'une masse de cristaux collée à la paroi du côlon.

Dans ce cas, le traumatisme de l'injection semble être exclu tout à fait : la petite masse de cristaux d'acide urique s'est fixée à la paroi intestinale et offre le même aspect que les dépôts sous-cutanés : un exsudat sérofibrineux contenant un grand nombre de leucocytes a remplacé la plus grande partie des cristaux injectés, seulement les cristaux du centre ne sont pas encore dissous, quoique leurs contours aient subi déjà une transformation visible.

Les autres cristaux injectés sont dissous et reprécipités en forme de rosaces d'urate de soude.

Dans la paroi intestinale il ne se trouve aucune cristallisation. La figure ci-contre est un dessin demi-schématique de cette préparation; la partie gauche est faite d'après une préparation qui avait été traitée pendant quelques heures par la formaline 10 0/0; l'acide urique est resté, les urates ont disparu.

La même expérience répétée sur un cobaye donne après 20 heures un résultat encore plus net (expér. 50). Entre deux lobes du foie, sur une place bien protégée et à l'abri de tout traumatisme, une petite quantité de cristaux d'acide urique, enveoppée de fibrine, avait trouvé place. Ce dépôt, examiné en coupes de paraffine, avait subi la même transformation : un noyau d'acide urique entouré par des leucocytes et des rosaces d'urate de soude. Dans le tissu du foie, pas de cristallisation.



On peut modifier les conditions de l'expérience. J'ai examiné des dépôts dans la paroi abdominale antérieure, sur le draphragme, entre les muscles, — toujours avec le même résultat.

3. *La cornée, fait-elle une exception ?*

Déjà Ebstein a injecté des cristaux d'acide urique dans le tissu de la cornée, mais apparemment il n'a pas suivi au microscope le sort de ces cristaux.

Leber a établi que les dépôts artificiels d'acide urique diminuent très vite et que le reste des cristaux, qu'il retrouve après 2 jours, est probablement constitué par de l'acide urique.

Pour savoir si la cornée faisait une exception, qu'on pouvait

soupçonner après les recherches de Leber, j'ai répété celles-ci.

Expérience 53 *b.* — Samedi 19 décembre 1903, 11 heures du matin, je fais chez un lapin un petit cul-de-sac à l'aide d'un bistouri, entre les lamelles de la cornée gauche, cocaïnisée; avec une spatule en platine je remplis le cul-de-sac avec une émulsion de cristaux d'acide urique en eau physiologique.

Le lendemain le dépôt est diminué à peu près de moitié, tandis que l'œil ne montre aucune réaction grave... A 3 heures, l'animal est sacrifié ; la cornée est étudiée sur des coupes à la paraffine.

Dans l'exsudat, qui remplit le cul-de-sac, il se trouve *quelques rosaces d'urate de soude ;* daus le tissu cornéal non modifié, il n'y a pas de cristaux.

La cornée se comporte donc comme les autres tissus.

4. *La cristallisation d'urate de soude se fait-elle dans du tissu normal ?*

Les préparations nombreuses provenant de différentes expériences montrent que partout la présence de l'urate de soude est limitée au dépôt d'acide urique, dont les frontières primitives sont toujours faciles à reconnaître grâce à une couche de leucocytes.

5. *L'acide urique peut-il être dissous dans les humeurs du corps, en dehors de l'influence des leucocytes ?*

Se comporte-il différemment de l'urate de soude ?

Les questions de ce genre se posent si souvent dans l'étude de l'immunité que le dispositif de l'expérience ne présentait aucune difficulté ; j'ai pensé que l'emploi des sacs de collodion me permettrait de répondre.

Expérience 54. — Deux sacs de collodion, montés sur des pipettes de Pasteur, sont remplis d'eau physiologique ; à l'un on ajoute des cristaux d'acide urique, à l'autre de l'urate de soude. Après stérilisation, les sacs sont introduits dans la cavité abdominale d'un lapin anesthésié à l'éther ; 17 janvier, l'animal est sacrifié ; à l'autopsie on retrouve les deux sacs, collés à la paroi abdominale antérieure et entourés par de la fibrine.

Le sac qui contenait, au commencement de l'expérience, l'émulsion de l'acide urique est devenu transparent, ne renferme plus que quelques cristaux ; sa paroi est intacte.

Le sac à l'urate de soude est un peu aplati : pour le reste il n'a subi aucune modification appréciable ; il semble [1] contenir la même quantité

1. Je ne me suis pas servi d'une méthode rigoureuse ; je comparais la quantité des cristaux en mesurant la hauteur du sédiment formé par les cristaux dans un même tube avant et après l'expérience.

d'urate de soude que celle qui y avait été introduite ; microscopiquement les cristaux ne se montrent pas changés.

La masse de fibrine autour des sacs ne contenait pas de cristaux.

Les humeurs du corps montrent non seulement *in-vivo* mais aussi *in vitro*, un pouvoir dissolvant vis-à-vis de l'acide urique. Une goutte d'un sérum filtré de lapin auquel on avait ajouté des cristaux d'acide urique donne, avec une goutte d'acide acétique des cristaux d'acide urique.

Si on examine après quelques jours le sédiment d'un tube contenant du sérum et des cristaux d'acide urique, on trouve une précipitation spontanée d'urate de soude. Ce fait intéressant, — il nous représente pour ainsi dire la formation d'un « *tophus in vitro* » est cité dans les mémoires de Robert[1] et de Mordhorst[2].

Selon le premier auteur on peut l'obtenir aussi avec une solution de chlorure de sodium (0,5 0/0) et de bicarbonate de soude (0,2 0/0).

6. *L'acide urique est-il précipité en entier, ou seulement en partie sous forme d'urates dans les dépôts artificiels?*

Quoiqu'il soit difficile de donner une réponse absolue, les expériences montrent que, très probablement, une partie de l'acide urique reste en dissolution et disparaît dans la circulation, tandis que le reste est précipité.

En faisant chez un lapin (expér. 28) 3 dépôts d'acide urique et 3 dépôts d'urate de soude, dans les mêmes conditions — en tenant compte du poids moléculaire — à gauche et à droite sous la peau du dos, je pouvais comparer la rapidité de la résorption des deux substances. Après 17 jours l'animal est sacrifié ; les 3 dépôts d'acide urique ont disparu sans laisser de trace; les autres — d'urate de soude — sont faciles à retrouver.

Ce qui prouve que très probablement une quantité assez considérable de l'acide urique est résorbée à l'état dissous.

7). *De quelle manière est résorbé l'urate de soude précipité?*

Les expériences de His avec Freudweiler, confirmées par les miennes, font déjà soupçonner par quel procédé les rosaces

1. Sir William Roberts, *III Croonian Lecture, British medical journal*, 2 July 1892.

2. C. Mordhorst, *Uratablagerungen bei Gicht. Vichow's archiv*. B. 48, 1897, page 285.

expérimentales disparaissent; après leur formation elles sont entourées par les leucocytes, dont le groupement, surtout dans les préparations à formaline, est caractéristique.

Les dépôts plus âgés confirment que les cristaux du tophus expérimental sont englobés par les phagocytes, comme Riehl et Rindfleisch l'ont décrit pour le tophus goutteux et His avec Freudweiler pour les cristaux injectés.

J'ai essayé d'examiner de plus près la résorption de l'urate de soude dans l'intérieur des phagocytes, en me servant de grenouilles (expér. 55-64).

Des cristaux d'urate de soude injectés dans la cavité abdominale d'une grenouille, sont englobés par des leucocytes; surtout par les macrophages qui apparaissent bourrés d'aiguilles cristallines; on trouve aussi de grands polynucléaires qui contiennent des cristaux, mais toujours en quantité peu considérable.

Le rouge neutre montre que la cellule répond d'abord par une réaction acide dans la région des cristaux englobés.

Ensuite des vacuoles à réaction nettement acide se forment, et la dissolution intracellulaire des cristaux commence.

Souvent on observe une aiguille dont le milieu est situé dans une vacuole trois fois plus petite que le cristal.

Plus tard, après plusieurs jours, on ne trouve que de petits morceaux de cristaux dans l'intérieur des vacuoles.

Les préparations faites avec l'exsudat péritonéal puisé depuis quelques heures, et traitées par le rouge neutre ou fixées à l'alcool et colorées par la thionine, montrent des cristaux *d'acide urique* dans l'intérieur des leucocytes.

Cette précipitation de l'acide urique en milieu acide, après la dissolution d'urate de soude (réaction bien connue), n'a pas été observée dans des préparations fraîches.

Des expériences pour déterminer la *chimiotaxie* de l'acide urique et de l'urate de soude vis-à-vis des leucocytes du cobaye et de la grenouille — en me servant des procédés de *Massart* et *Bordet*, *Buchner*, *etc.*, ont montré qu'elle est indifférente; c'est-à-dire qu'elle ressemble à la chimiotaxie de l'eau physiologique servant comme contrôle.

RÉSUMÉ

L'observation de Freudweiler, que des cristaux d'acide urique introduits sous la peau du lapin disparaissent par phagocytose, n'est pas confirmée.

L'acide urique, au contraire, est facilement dissous dans les humeurs *in vivo* et *in vitro*.

Dans les humeurs du corps qui contiennent de l'acide urique en solution concentrée — *in vitro* ainsi qu'*in vivo* — il se fait facilement une précipitation d'urate de soude en forme d'aiguilles agglomérées, qui sont identiques aux cristallisations des tophus goutteux.

Cette précipitation n'a pas lieu dans les tissus normaux.

L'urate de soude qui se trouve dans les tissus du corps par précipitation, ou qui y est introduit par injection, disparaît par réaction phagocytaire.

L'urate de soude est dissous dans le protoplasme des phagocytes de la grenouille à l'aide d'une réaction acide.

Les phénomènes trouvés ou confirmés par cette recherche ne sont pas d'une importance assez grande pour qu'il soit déjà permis de critiquer à leur aide les différentes théories de la goutte.

Je ne les considère que comme un deuxième pas dans la voie inaugurée par les expériences de His et Freudweiler.

Puisqu'il est nettement démontré, par l'expérimentation, que l'acide urique, dissous dans les humeurs des tissus, peut cristalliser sous une forme qui est identique aux précipitations dans le corps du malade goutteux, il sera possible d'établir par l'expérimentation les conditions dans lesquelles cette précipitation se fait.

Déjà maintenant on peut s'expliquer le rôle des traumatismes qui causent si souvent un accès véhément chez les malades goutteux.

L'exsudat qui suit le traumatisme est, chez le goutteux, un liquide contenant de l'acide urique en quantité anormale; nos expériences ont montré la facilité avec laquelle la cristallisation d'urate de soude se fait dans les exsudats et le sérum *in vitro*.

Les accès qui suivent l'influenza — maladie provoquant souvent des inflammations articulaires — peuvent être expliqués en admettant une exsudation suivie de cristallisation.

Au point de vue pharmacodynamique, l'expérimentation avec des sacs de collodion peut rendre des services considérables ; en introduisant des urates, à l'abri des phagocytes, dans les tissus, on pourra étudier quantitativement l'influence de moyens thérapeutiques.

Il n'est pas temps encore d'aborder les questions théoriques; mais il n'y a aucun doute que la poursuite des recherches sur l'acide urique, dans la direction indiquée par Roberts, combinée aux expériences *in vivo*, permette d'explorer un terrain si mal connu.

ERRATUM

Numéro du 25 juin.

Page 343, ligne 15, au lieu de « une allégresse », lire « un entrain ». Ligne 25, au lieu « il dut l'interrompre », lire « il dut interrompre ».

Page 344, ligne 12, au lieu de « en 1862 », lire « en 1863 ». 3e ligne en partant du bas de la page, au lieu de « Lorsqu'il y a un ou plusieurs », lire « lorsqu'il y a plusieurs ».

Page 352, ligne 2, au lieu « sous le titre de Microbes et Maladie », lire « Le Microbe et la Maladie ».

Page 354, intercaler entre ligne 9 et ligne 10 « Fermentation. London. W. Clowes and Sons, 1884 ».

Le gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE AOUT 1904 N° 8

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE L'ÉPURATION DES EAUX RÉSIDUAIRES
DES VILLES ET DES INDUSTRIES

PAR LE Dr A. CALMETTE
Directeur de l'Institut Pasteur de Lille.

L'un des plus graves problèmes dont la solution s'impose aux villes et aux grandes industries est celui de l'*épuration des eaux résiduaires*.

Par ce terme *épuration*, il faut entendre la destruction complète des matières organiques putrescibles et la *minéralisation* de celles-ci, c'est-à-dire leur désintégration en éléments minéraux simples.

On a longtemps confondu et on confond encore souvent l'*épuration* avec la *clarification*. Or, la clarification des eaux résiduaires se borne à réaliser la séparation mécanique, ou la précipitation par des réactifs chimiques des particules flottantes non dissoutes ou coagulables. Elle ne réalise pas une véritable *épuration*, car elle laisse intactes toutes les substances organiques dissoutes telles que les peptones, les amides, l'ammoniaque. L'eau qui renferme une proportion plus ou moins considérable de ces substances est putrescible; elle reste mal odorante; elle pollue les cours d'eau et elle est nuisible à la vie des poissons ou des plantes. On ne peut donc pas la considérer comme *épurée*.

Toutes les fois qu'on traite des eaux résiduaires industrielles par la simple décantation ou par des réactifs divers, chaux, sulfate d'alumine, sulfate ferreux ou sulfate ferrique, chlorures

ou hypochlorites alcalins, on fait de la *précipitation*, on débarrasse l'eau des matières albuminoïdes coagulables et des corps flottants, mais l'épuration reste incomplète.

Les seuls agents capables d'effectuer la désintégration et la minéralisation des molécules organiques sont les *microbes* ou la combustion directe par le feu.

Ce sont les microbes qui désagrègent et décomposent les cadavres d'animaux et de végétaux, et les fumiers que l'on enfouit dans la terre ou qui s'accumulent à la surface de celle-ci.

Ce sont eux encore qui réalisent l'épuration spontanée des rivières ou des fleuves auquels l'homme confie le soin d'éloigner de lui les déchets de la vie.

Et c'est grâce à eux enfin que, dans le procédé de l'*épandage*, le sol cultivé transforme les souillures de toutes sortes qu'on déverse à sa surface en éléments gazeux qui s'échappent dans l'atmosphère sous forme de vapeur d'eau, d'azote libre ou d'acide carbonique, et en nitrates de soude, de potasse ou de chaux qui servent d'aliments aux plantes.

Il était donc tout indiqué qu'à partir du moment où ce rôle des microbes nous fut révélé par la science, on cherchât à adapter ceux-ci plus directement à nos besoins de destruction rapide des résidus de nos agglomérations et de nos industries.

Et c'est ainsi qu'on a été amené à la découverte des procédés récents d'épuration biologique, sur lesquels l'attention des ingénieurs sanitaires et des hygiénistes du monde civilisé est aujourd'hui concentrée.

Je dois me borner à indiquer ici les principes sur lesquels s'appuient les principaux d'entre eux, et j'exposerai brièvement le plan des recherches nouvelles que j'ai pu entreprendre à leur sujet à l'Institut Pasteur de Lille et dans l'installation expérimentale de La Madeleine, grâce aux libéralités de la Caisse nationale des recherches scientifiques.

* * *

L'*épuration biologique* des eaux résiduaires peut être réalisée par diverses méthodes basées sur le travail exclusif des microbes, ou par des systèmes mixtes qui utilisent certains réactifs chimiques avec des actions microbiennes consécutives.

Lorsqu'on s'adresse aux microbes seuls, il faut que ceux-ci désagrègent et dissolvent d'abord les corps organiques en suspension dans l'eau, et qu'ils oxydent ensuite les molécules organiques dissoutes, pour les minéraliser.

Dans le second cas, si l'on fait précéder les actions microbiennes de l'emploi d'un réactif chimique capable de précipiter les matières en suspension et les albuminoïdes coagulables, le rôle des microbes se réduit à un travail d'oxydation et de minéralisation des molécules organiques dissoutes.

La détermination des matières entraînées par les eaux nous montrera tout de suite quels peuvent être les avantages et les inconvénients respectifs de ces deux systèmes.

***

Les eaux d'égout des villes et les eaux résiduaires industrielles contiennent, en proportions très variables, deux sortes de substances :

1° Des substances *ternaires*, composées surtout de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, et dont les plus importantes sont les résidus cellulosiques de papier ou de végétaux, l'amidon, les dextrines et les sucres, les alcools, les acides organiques (lactique, malique, succinique, etc.), les matières colorantes et les graisses;

2° Des substances *quaternaires* composées elles aussi de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, et en plus d'azote, avec des proportions plus ou moins considérables d'autres corps minéraux simples tels que le soufre, le phosphore, l'arsenic, le fer, le manganèse, les métaux alcalins ou alcalino-terreux, etc. On les trouve dans les résidus animaux et dans une foule de détritus végétaux. Les principales sont la fibrine, les albumines, caséines, la lécithine, l'urée, le gluten, etc.

La désintégration moléculaire des substances ternaires s'effectue surtout par des microbes *anaérobies* ou par des espèces microbiennes capables de vivre en anaérobies facultatifs, c'est-à-dire à l'abri de l'oxygène de l'air. Ces microbes empruntent alors l'oxygène dont ils ont besoin comme tous les êtres vivants aux substances mêmes qu'ils décomposent et cette décomposition aboutit à la formation d'hydrogène libre ou

d'hydrogène carboné (CH^4 ou gaz des marais) et d'acide carbonique.

Les substances quaternaires, abondantes surtout dans les eaux d'égout des villes ou de certaines industries (abattoirs, laiteries, tanneries), peuvent être désintégrées par une multitude d'espèces microbiennes *anaérobies*, *anaérobies facultatives* ou *aérobies*. Leur désintégration s'opère par une série d'étapes successives qui aboutit à la formation de peptones, de composés ammoniacaux et d'ammoniaque libre, puis de nitrites et de nitrates alcalins, avec élimination d'une proportion plus ou moins grande d'azote, d'hydrogène libre ou carboné et d'acide carbonique.

Suivant que l'un ou l'autre de ces deux ordres de substances prédominera, il sera plus avantageux, au point de vue économique, de confier aux actions microbiennes le soin de détruire la totalité des matières contenues dans les eaux à épurer, ou de séparer d'abord, par une précipitation mécanique ou chimique celles de ces matières qui peuvent être vendues avec profit comme engrais.

On ne doit pas se dissimuler cependant que la récupération des résidus, même riches en azote, des eaux d'égout, est une opération rarement rémunératrice. Au début d'une exploitation de quelque importance on parvient presque toujours à écouler ces résidus au voisinage des grandes villes. La culture les achète volontiers. Mais bientôt, celle-ci n'en ayant plus l'utilisation immédiate, on est obligé de les céder à vil prix, puis de payer pour s'en défaire, parce qu'on ne peut les laisser s'accumuler et qu'il devient indispensable de les évacuer au loin. Les frais de transport deviennent alors plus élevés que leur valeur propre.

Toutes les villes qui ont essayé l'application en grand des systèmes d'épuration chimique ont éprouvé ces vicissitudes et ces déboires. On ne saurait en être surpris si l'on veut bien réfléchir à ce fait que partout, à l'heure actuelle, l'usage des engrais chimiques s'est largement répandu, et qu'il est facile aux cultivateurs éclairés de se procurer des engrais riches dont 100 kilogrammes renferment une valeur de 10 à 12 francs d'azote par exemple. Pourquoi ces mêmes cultivateurs s'aviseraient-ils alors de transporter à grands frais 2 ou 3,000 kilo-

grammes de boues sèches, valant ensemble 10 ou 12 francs d'après leur teneur en azote, c'est-à-dire exactement ce qu'ils peuvent trouver dans 100 kilogrammes d'un engrais chimique de composition plus constante et répondant plus exactement à leurs besoins?

Outre cet inconvénient si grave de l'encombrement des boues, les procédés chimiques en présentent d'autres également redoutables : ils obligent à des dépenses continuelles pour l'achat de réactifs, et pour que ceux-ci agissent efficacement, il est indispensable de varier à chaque instant leurs proportions dans l'eau à traiter, suivant les changements incessants de composition que présente celle-ci. Dans les villes aussi bien que dans les industries, les eaux résiduaires subissent de larges oscillations dans leur volume, dans leur aspect et dans la nature des résidus qu'elles reçoivent. Il est facile de comprendre que les quantités de réactifs à mélanger doivent osciller parallèlement, si l'on veut que la précipitation s'effectue d'une manière satisfaisante. Et c'est là, peut-être, la difficulté la plus difficile à vaincre!

Toutes ces considérations nous incitent à chercher plutôt la solution du problème du côté des systèmes d'épuration exclusivement biologiques. Ceux-ci, du moins, visent à la suppression des boues et à la suppression des réactifs, en même temps qu'ils réalisent une épuration vraie par la désintégration totale des matières organiques et non plus seulement la précipitation des matières en suspension ou des substances albuminoïdes coagulables.

*
* *

Épuration par le sol. Épandage.

Le prototype de ces systèmes biologiques est représenté par l'*épandage*, avec ou sans utilisation agricole. Le sol est, sans conteste, le meilleur agent d'épuration, parce qu'il constitue l'habitat normal des innombrables espèces microbiennes auxquelles la nature a confié le soin de décomposer toutes les substances organiques végétales ou animales, résidus ou déchets des êtres vivants.

Mais, pour qu'il soit efficace, deux conditions essentielles

s'imposent : le sol choisi doit être *très absorbant* et *perméable à l'air*.

L'épandage n'est donc possible que sur les sols poreux, profonds et très bien drainés.

Dans le nord de la France, les sols de porosité moyenne sont capables d'épurer environ 110 mètres cubes d'eau d'égout par jour et par hectare sur 1 mètre de profondeur. Or ce chiffre, qui correspond à 40,000 mètres cubes par hectare et par an, est celui qui a été adopté par la ville de Paris pour les champs d'épandage d'Achères.

Il ne peut être que rarement dépassé.

A ce taux, une ville de 100,000 habitants, produisant, avec le tout à l'égout, à raison de 100 litres par habitant et par jour, 10,000 mètres cubes d'eaux résiduaires ou 3,650,000 mètres cubes par an, nécessiterait une surface d'épandage égale à 91 hectares.

En supposant qu'une telle surface, uniformément perméable, fût disponible à son voisinage, elle serait le plus souvent d'un prix trop élevé.

Et si l'on tient compte de la difficulté extrême que rencontrent les villes à se procurer à bon compte des terrains peu éloignés et convenables pour l'épandage, on comprend que ce système d'épuration n'ait pu être adopté que par de grandes capitales comme Paris, Berlin, ou par quelques villes comme Reims, qui avaient à leurs portes de vastes terrains sablonneux ou calcaires très absorbants et presque sans valeur.

Les cités industrielles du nord de la France, Lille, Roubaix, Tourcoing, pour ne citer que les plus importantes, ne songeront jamais à s'adresser à lui pour épurer leurs eaux d'égoût. Outre que le sol arable y possède une valeur énorme (10,000 francs l'hectare), sa perméabilité est très faible à cause de la couche épaisse d'argile qui recouvre les assises calcaires sur presque toute la région.

Il est incontestable, d'autre part, que l'épandage présente, au point de vue de l'hygiène, des inconvénients graves qui ne permettent plus d'en conseiller l'emploi lorsqu'on peut l'éviter; l'exemple de Gennevilliers et d'Achères, et surtout celui de Carrières-Triel, montrent que les nappes souterraines qui alimentent les puits des villages voisins se contaminent trop facile-

ment par les infiltrations profondes du sol, et que la grande culture sur laquelle on avait fondé tant d'espérances, souffre très souvent d'être obligée d'absorber de trop grandes quantités d'eau d'égout.

C'était d'ailleurs une erreur de compter, comme on l'a fait au début, sur le rôle épurant de la culture. On supposait que les plantes agissaient de deux manières en se développant : on pensait que la pénétration de leurs racines rendait le sol plus perméable, ce qui est exact ; mais on croyait aussi qu'elles pouvaient utiliser pour leur nutrition une grande partie des matières organiques de l'eau d'égout. Or la science a montré, depuis les acquisitions récentes de la physiologie végétale et de la bactériologie, que les plantes ne peuvent assimiler les matières organiques qu'à l'état de nitrates solubles. Il faut, pour que ces matières organiques servent d'aliments aux plantes, qu'elles soient préalablement minéralisées ou transformées en nitrates solubles par les actions microbiennes dues aux ferments figurés du sol. Il y a donc tout avantage à réaliser cette transformation dans les eaux résiduaires avant d'utiliser celles-ci pour l'irrigation.

Enfin, il est aujourd'hui démontré que l'accumulation des matières organiques en train de se décomposer à la surface du sol arable favorise le développement et la multiplication d'insectes tels que les moustiques et les mouches, dont le rôle comme agents de transmission des maladies infectieuses apparaît de plus en plus important. Elle favorise aussi le développement, sur les végétaux, de toutes sortes de vers et de parasites intestinaux (trichocéphales, ascaris, oxyures), capables de produire des désordres souvent graves chez l'homme et chez les animaux domestiques nourris avec les légumes crus ou avec les fourrages que l'on cultive sur les champs d'irrigation.

Le seul moyen d'éviter ces inconvénients consiste à ne pratiquer l'épandage que sur les sols perméables, *non cultivés* ou seulement boisés, assez loin de toute agglomération et même de toute habitation pour que les nappes souterraines superficielles qui alimentent des forages et des puits ne puissent en éprouver aucune contamination.

***

Épuration biologique

Les acquisitions de la science relatives à la putréfaction et aux fonctions des microbes du sol arable comme agents de désintégration des matières organiques devaient forcément conduire les chimistes et les bactériologistes à l'essai de procédés d'épuration exclusivement *biologiques*. En précisant les conditions nécessaires à la vie des microbes capables, d'une part, de solubiliser les substances ternaires et quaternaires complexes que charrient les eaux d'égout, et, d'autre part, d'en disloquer les molécules pour les ramener à l'état d'éléments minéraux simples, on devrait théoriquement réaliser la destruction complète de tous les détritus humains, animaux et végétaux.

On pouvait donc concevoir un système idéal d'assainissement qui supprimerait les accumulations de boues encombrantes laissées par la précipitation chimique et qui permettrait de ne rendre au sol arable, aux rivières et aux fleuves, que des eaux parfaitement limpides et imputrescibles, immédiatement utilisables, s'il le fallait, pour les besoins alimentaires, agricoles ou industriels de l'homme.

Il ne semble plus douteux aujourd'hui que ce but soit bien près d'être atteint.

Les expériences poursuivies depuis 10 ans à la suite des importantes démonstrations de Dibdin, de sir Henry Roscoë, de Percy Frankland, de Gilbert Fowler en Angleterre, de Dunbar en Allemagne, de Hiram Mills et Kinnicut en Amérique, ont forcé l'attention des ingénieurs sanitaires de tous les pays.

Plus de 22 villes anglaises, au premier rang desquelles il convient de citer la grande ville industrielle de Manchester, n'emploient déjà plus que les procédés *biologiques ou bactériens* pour se débarrasser de leurs eaux d'égout et, malgré les tâtonnements inévitables dans l'application pratique de toute nouvelle découverte, les résultats obtenus sont déjà signalés partout comme très satisfaisants.

* * *

Le système bactérien appliqué aux eaux du tout à l'égout comprend 3 *phases* bien distinctes :

1° La décantation et la séparation des résidus solides non

putrescibles (sable, gravier, scories, charbon, débris de fer, de pierres, etc.);

2° La dissolution des matières organiques par *fermentation anaérobie en fosse septique*;

3° La transformation des matières organiques dissoutes en nitrites et en nitrates par *oxydation sur lits bactériens aérobies.*

Dans la première phase, purement mécanique, les microbes ne jouent aucun rôle. Il s'agit seulement d'empêcher l'introduction, dans les fosses septiques, des corps étrangers minéraux, plus ou moins abondants dans toutes les eaux d'égout, qui ne sont pas susceptibles de se décomposer et qui entraîneraient bientôt une réduction importante de la capacité des fosses septiques.

La seconde phase est d'une importance capitale. Elle consiste à recevoir dans des bassins de 3 mètres de profondeur environ, qui doivent rester constamment pleins, toutes les substances organiques putrescibles qui restent en suspension dans l'eau : les débris de papier, de végétaux divers, les détritus ménagers de toutes sortes (viandes, graisses), les résidus d'abattoirs ou de laiteries, les excréments humains et animaux, les déchets industriels.

La dimension des fosses septiques doit être calculée de telle manière que les eaux qui y pénètrent puissent y séjourner pendant environ 24 heures; c'est-à-dire qu'à chaque quantité d'eau admise à l'entrée, doit correspondre un volume égal à la sortie. Les fosses restent ainsi constamment pleines, et déjà quelques jours après leur mise en travail, il s'y établit une fermentation spontanée très active. Les microbes anaérobies s'y multiplient en formant un véritable levain et s'attaquent à toutes les molécules organiques solides en suspension, aussitôt que celles-ci arrivent à leur contact.

Lorsque ce levain est constitué, on trouve qu'il est capable de dissoudre, en 24 heures, un poids de matières organiques en suspension égal à celui que les eaux d'égout apportent dans le même temps. Il en résulte que, même après plusieurs années de fonctionnement, le volume des boues qui se déposent au fond des fosses n'augmente plus.

Au sortir des fosses septiques, l'effluent ne contenant plus que

des matières organiques dissoutes (à l'état de peptones, d'amides ou d'ammoniaque libre), doit être dirigé vers un canal collecteur qui permette le déversement alternatif sur une série de lits bactériens d'oxydation, où l'épuration proprement dite s'effectuera : c'est la 3me phase.

Celle-ci, dans le langage technique adopté, comporte 1, 2 ou 3 *contacts* successifs sur lits bactériens, c'est-à-dire que l'eau à épurer devra traverser successivement 1, 2 ou 3 bassins peu profonds, remplis de scories ou mâchefer, qui servent de supports aux microbes oxydants.

Ces bassins, dont la capacité utile est telle que chacun d'eux puisse être facilement rempli en 1 heure et vidé dans le même temps, sont construits en pente douce, à partir de la vanne d'entrée jusqu'à la vanne de sortie, et d'un draînage en forme d'arête de poisson, assurant l'écoulement facile de l'eau qui y est admise.

On y entasse, sur 1 mètre environ d'épaisseur, d'abord des grosses scories au-dessus des drains, puis des scories de 5 centimètres de diamètre environ, puis, à la surface, des scories fines criblées, de 1 centimètre à 5 millimètres de diamètre.

L'eau recueillie au sortir des fosses septiques dans le canal collecteur est déversée sur chaque lit au moyen d'un déversoir en éventail, et des rigoles rayonnantes assurent sa répartition régulière dans toute l'étendue du lit. Elle y séjourne pendant un temps variable qui n'excède jamais 2 *heures*. On la dirige ensuite sur un second lit bactérien exactement semblable au premier ; elle y reste encore pendant 2 *heures*. C'est le *second contact*.

Après ce second contact, l'épuration est ordinairement parfaite. Un troisième contact sur un troisième lit n'est nécessaire que lorsqu'il s'agit d'épurer certaines eaux résiduaires d'usines extrêmement chargées. Celles, très diluées, du tout à l'égout des villes sont, en général, suffisamment épurées après un seul contact.

J'ai indiqué tout à l'heure que les scories des lits bactériens servent de supports aux microbes oxydants. Ceux-ci sont apportés par les eaux d'égout elles-mêmes. Ils se multiplient dans les anfractuosités des scories et fixent la matière organique dissoute comme par une sorte de phénomène de teinture. Cette fixation ne s'effectue bien que lorsque les lits sont *mûrs*, c'est-à-dire

après 1 ou 2 mois de fonctionnement, lorsque les microbes aérobies sont assez nombreux.

A partir de ce moment, on règle les périodes alternatives d'immersion et d'aération des lits de la manière suivante :

1 heure pour remplir ;

2 heures de plein ;

1 heure pour vider ;

4 heures de vide, pour aérer les scories ;

soit 8 *heures* par période.

Chaque lit peut fonctionner suivant 3 périodes semblables par jour de 24 heures.

Si leur capacité est calculée de manière à ce qu'à chaque période ils puissent recevoir en moyenne 333 litres d'eau d'égout par mètre cube ou par mètre carré de surface de lit (1/3 de la capacité volumétrique des lits, les deux autres tiers étant occupés par les scories), il en résulte qu'on peut déverser facilement sur chaque lit 1 mètre cube d'eau d'égout par mètre carré de surface et par jour.

Avec 2 contacts, on épurera donc, au total, 500 litres par mètre carré de surface et par jour, soit 5,000 mètres cubes par hectare et par jour, c'est-à-dire un volume d'eau d'égout au moins *45 fois plus considérable que par l'épandage* (*5,000* mètres cubes par hectare et par jour au lieu de *110* mètres cubes si l'on adopte le taux réglementaire pour les champs d'épandage parisiens).

L'eau sortant du second lit bactérien, et souvent même du premier, doit être rendue imputrescible, d'une limpidité égale à celle des eaux de rivière, et inoffensive pour les plantes aquatiques et les poissons.

Lorsque les bassins de décantation séparent bien les matières lourdes imputrescibles (sable, gravier, charbon et scories), et lorsque la solubilisation en fosse septique des matières putrescibles s'effectue convenablement, les scories qui servent de supports aux microbes oxydants ne reçoivent que des eaux chargées de substances organiques *dissoutes :* elles ne se colmatent ou ne s'encrassent donc jamais et elles restent intactes pendant de longues années. Tout au plus doit-on, tous les 2 ou 3 mois, râcler leur surface au râteau et, tous les 4 ou 5 ans, retourner à la bêche leurs couches superficielles.

On pouvait craindre que, pendant les hivers rigoureux, la congélation des lits empêchât les phénomènes d'oxydation de se produire. L'expérience a prouvé que cette éventualité devait être écartée : les eaux d'égout sont toujours maintenues assez chaudes par les fermentations exothermiques qu'elles subissent, pour empêcher le gel des scories, et on a constaté en Angleterre que, même par les plus grands froids, la nitrification s'effectue avec une activité un peu ralentie mais suffisante pour assurer l'épuration.

Dans toutes les villes anglaises, déjà nombreuses, où le système biologique a été appliqué à l'épuration des eaux d'égoût (Manchester, Exeter, Yeovil, Birmingham, York, Hampton, Huddersfield, Lincoln, Oldham, Oswestry, Sheffield), les autorités sanitaires sont unanimes à déclarer que ses résultats sont des plus satisfaisants. Les dispositions adoptées dans la plupart de ces villes sont cependant loin d'être parfaites et elles ne réalisent qu'incomplètement les 3 phases essentielles que j'ai décrites.

En certains endroits, comme à Hampton, on n'a aménagé ni chambres de décantation pour séparer les corps lourds imputrescibles, ni fosses septiques, et on reçoit directement l'eau d'égout sur une série successive de 3 étages de lits bactériens. Il en résulte que le premier lit fonctionne mal, se colmate et nécessite soit des périodes de repos prolongées, soit un labourage trop fréquent.

A Manchester même, où l'installation est, de beaucoup, la plus parfaite et la plus grandiose qu'on puisse voir, on a voulu utiliser comme fosses septiques, et par mesure d'économie, d'anciens bassins de précipitation chimique qui ne sont ni assez vastes ni assez profonds pour permettre la bonne marche des fermentations anaérobies. On a négligé aussi d'assurer, par des bassins de décantation préalable, la séparation des corps lourds, imputrescibles, de sorte que les fosses septiques reçoivent une grande quantité de sable, de scories et de charbon. Leur capacité volumétrique se trouve ainsi réduite en quelques semaines aux 2/3 de la capacité initiale, et on est obligé de les vider, ce qui n'arrive jamais lorsqu'on prend soin, comme à Birmingham, de n'y admettre qne des eaux bien décantées.

On discute encore la question très importante de savoir s'il

convient de couvrir les fosses septiques, comme le préconise Cameroun et le *Septic Tank Syndicate*, ou s'il est possible d'éviter cette dépense considérable en laissant une profondeur suffisante aux fosses septiques pour que les fermentations anaérobies s'y poursuivent régulièrement.

Enfin, une foule de systèmes, pour l'exploitation desquels leurs inventeurs ont pris des brevets, proposent de supprimer l'intermittence de fonctionnement des lits bactériens et de répartir l'eau d'égout à la surface de ces derniers à l'aide de moyens mécaniques souvent aussi compliqués qu'ingénieux (tourniquets hydrauliques, gouttières basculantes, etc.).

Tels sont les systèmes Stoddart, Wittaker-Bryant, Werner-Candy, etc.

*
* *

Installation expérimentale de la Madeleine

On voit donc combien sont nombreux les essais tentés par nos voisins d'Outre-Manche en vue d'appliquer le travail des microbes à l'épuration aussi complète et aussi rapide que possible des eaux d'égoût.

En Allemagne et, plus encore, aux États-Unis, on se préoccupe activement de résoudre le même problème. Dunbar à Hambourg, Kinnicut à Worcester (États-Unis) ont publié, dans cet ordre d'idées, d'importants travaux dont nous devons faire notre profit.

En France, il n'est malheureusement pas douteux qu'un très petit nombre d'hygiénistes sont au courant de ces questions, pourtant d'une si haute portée. Dans les sphères officielles, on considère encore l'épandage comme réalisant l'idéal de la perfection, et sous prétexte qu'il donne d'excellents résultats partout où on dispose de terrains suffisamment vastes et perméables pour l'appliquer, comme à Paris et à Reims, on oublie trop que la plupart des grandes villes, pour les raisons que j'ai indiquées précédemment, sont dans l'impossibilité absolue d'y avoir recours.

J'ai donc pensé qu'il était nécessaire, non seulement de répandre dans nos milieux scientifiques les notions qui se dégagent déjà très nettes des travaux étrangers, mais d'instituer aussi chez nous, à proximité d'une grande ville industrielle et

d'un laboratoire bien outillé, de nouvelles recherches orientées dans la même direction. Grâce à la Caisse nationale des recherches scientifiques, qui a bien voulu mettre à ma disposition les crédits indispensables, et grâce aussi au mouvement d'opinion et de solidarité provoqué par le Consortium d'assainissement du Nord, sous l'impulsion énergique et dévouée de son président M. Ory, j'ai pu organiser à Lille tout un centre d'études pour cet objet.

Avec la collaboration de M. A. Buisine, professeur de chimie industrielle à la Faculté des Sciences, de M. le docteur Marmier, de MM. Rolants, Boullanger, Bonn, Constant et Massol, chimistes ou ingénieurs agronomes, et de M. Le Noan, conducteur des ponts et chaussées, j'ai tracé tout un programme de travaux dont les résultats devront être contrôlés par une commission supérieure composée des membres de la Caisse des recherches scientifiques et de délégués du Comité consultatif d'hygiène de France.

Je me suis proposé tout d'abord de réaliser à proximité de la ville de Lille, et en empruntant tout l'égout collecteur d'un de ses faubourgs, une grande expérience d'épuration d'eaux d'égoût particulièrement difficiles à épurer à cause de leur concentration et de leur teneur élevée en résidus industriels de toutes sortes (brasseries, teintureries, filatures, usines métallurgiques). J'ai arrêté mon choix sur l'égoût collecteur de la Madeleine, qui se déverse dans la Basse-Deûle en un point très voisin des fortifications de Lille, et dont le débit moyen oscille entre 500 et 700 mètres cubes par 24 heures.

J'ai donc loué sur la rive droite de la Basse-Deûle un terrain de 1,500 mètres carrés de superficie, surélevé d'environ $1^{m},90$ au-dessus du niveau supérieur de la rivière, et j'ai dérivé vers l'angle le plus élevé de ce terrain, la totalité de l'égout collecteur dont il s'agit. L'espace dont je disposais ainsi m'a permis d'aménager toute une installation d'expériences pour l'épuration biologique, chimique ou chimico-bactérienne, d'un volume d'eau d'égout tel qu'on ne puisse plus objecter qu'il s'agit là de simples essais de laboratoire. J'y trouvais en outre la possibilité d'expérimenter simultanément ou successivement, *sur la même eau d'égout*, tous les systèmes d'épuration qu'il était intéressant ou utile de mettre à l'étude. Je dressai donc mes plans de

manière à ce que cette même eau pût être soumise aux traitements ci-après :

1° Décantation des matières minérales non putrescibles, et séparation des corps flottants de plus de 5 centimètres de diamètre;

2° Fermentation anaérobie en fosse septique *ouverte* à l'air libre, de 3 mètres de profondeur;

3° Fermentation anaérobie en fosse septique *couverte* de 3 mètres de profondeur;

4° Oxydation de l'effluent de chaque fosse septique sur lits bactériens aérobies;

5° Épuration directe de l'eau d'égout sur lits bactériens, sans fermentation anaérobie en fosse septique;

6° Traitement initial des eaux d'égout par divers réactifs chimiques;

7° Oxydation sur lits bactériens aérobies de l'effluent chimique, après séparation des boues précipitées.

Les plans de cette installation d'expériences (v. fig. 1 et 2) indiquent très clairement la disposition respective des fosses septiques, l'une ouverte, l'autre couverte; celle du bassin collecteur destiné à recevoir les eaux sortant des fosses septiques et celle des lits bactériens de premier et de second contact, qui reçoivent les eaux à épurer du bassin collecteur.

Au point d'arrivée des eaux en D (fig. 1), celles-ci passent à travers une grille à larges mailles et pénètrent dans l'ouverture rectangulaire d'un déversoir qui permet d'en mesurer constamment le débit, soit par l'épaisseur de la lame d'eau déversée, soit au moyen d'un enregistreur de niveau, mû par un mouvement d'horlogerie.

Du déversoir, les eaux passent, à volume égal, dans leurs bassins de décantation ou chambres à sable (*uu*) qui ont chacune 2 mètres cubes de capacité, 1 mètre de profondeur et dont il est facile d'enlever, avec une drague à main, tous les corps lourds qui s'y déposent. Elles sont ensuite dirigées, toujours en volume égal, dans chacune des 2 fosses septiques dont la capacité volumétrique est de 250 mètres cubes, soit 500 mètres cubes pour les deux fosses. Leur profondeur utile est de $2^m,60$. Elles sont munies de 5 cloisons incomplètes ou *chicanes* (fig. 2, coupe suivant CDEF) alternativement disposées de la

surface à $0^m,60$ du fond, et du fond à $0^m,60$ de la surface.

L'extrémité de chaque fosse septique opposée à celle où l'eau arrive est munie d'un déversoir F et H (fig. 1) qui prend seulement la nappe d'eau située à $0^m,50$ de la surface, de manière à ne point entraîner les croûtes ni les matières grasses flottantes, dont la décomposition n'est pas achevée.

La fosse septique couverte est munie de 2 cheminées de $0^m,10$ de diamètre (55, fig. 2, coupe suivant GH) permettant l'évacuation et l'analyse chimique des gaz qui résultent de la fermentation à l'abri de l'air.

Le bassin collecteur destiné à recevoir l'effluent de chacune des 2 fosses, ou, si l'on veut, directement l'eau d'égout brute, a 50 mètres cubes de capacité et seulement $0^m,40$ de profondeur utile. Il commande les vannes de déversement sur les lits bactériens aérobies, de premier contact (*vv*).

Entre les lits de premier et de second contact, j'ai disposé une rigole permettant d'évacuer directement à la rivière l'eau sortant des premiers lits (par F et G) ou de diriger celle-ci à volonté sur chacun des 2 lits de second contact.

Les lits bactériens, au nombre de 4 (2 pour le premier et 2 pour le second contact), ont chacun 150 mètres cubes de capacité volumétrique et 50 mètres cubes de capacité utile, les deux tiers de la capacité volumétrique étant occupés par les scories. Le drainage et la distribution des eaux à leur surface est disposé, comme je l'ai indiqué précédemment, de manière à assurer une répartition aussi égale que possible de l'eau à épurer dans toute la masse des scories, et de manière à assurer, après chaque période d'immersion, la vidange rapide et l'aération facile des lits.

Les vannes de sortie après le second contact (°°) déversent l'eau complètement épurée à la rivière (par *g*.). Une dérivation permet de recueillir dans un petit bassin spécial 2 mètres cubes d'eau épurée, afin de se rendre compte de son aspect et de son aptitude à permettre la vie des plantes et des poissons.

Une autre dérivation, avant l'entrée aux fosses septiques (en *b*), dirige vers deux bassins de précipitation chimique l'eau brute sur laquelle il s'agit d'expérimenter les divers réactifs chimiques dont l'emploi pourrait paraître avantageux.

Toute l'installation d'épuration bactérienne a été mise en

marche le 8 juillet. La maturation des lits bactériens exigeant environ 1 mois, je publierai seulement à la fin de cette année 1904 les premiers résultats d'ensemble que nous fourniront les analyses.

Je me borne à indiquer ci-dessous la composition moyenne des eaux de l'égout collecteur de la Madeleine à l'entrée des fosses septiques.

Ces eaux, dont l'aspect est noir et l'odeur putride sulfhydrique, ont une réaction le plus souvent alcaline, correspondant entre 35 et 365 milligrammes de carbonate de chaux par litre. Elles renferment de 235 à 882 milligrammes de matières organiques et de $0^{gr},670$ à $1^{gr},367$ milligrammes de matières minérales dissoutes, de 3 à 24 milligrammes d'ammoniaque libre ou saline et de 1 à 19 milligrammes d'azote organique.

Elles sont de beaucoup plus souillées que les eaux de la Deule dans laquelle elles se déversent et qui, à la même période, donnaient, à l'analyse, de 145 à 170 milligrammes de matières organiques et de 242 à 295 milligrammes de matières minérales dissoutes, avec 3 à 8 milligrammes d'ammoniaque libre ou saline et 0,7 à 3 milligrammes d'azote organique.

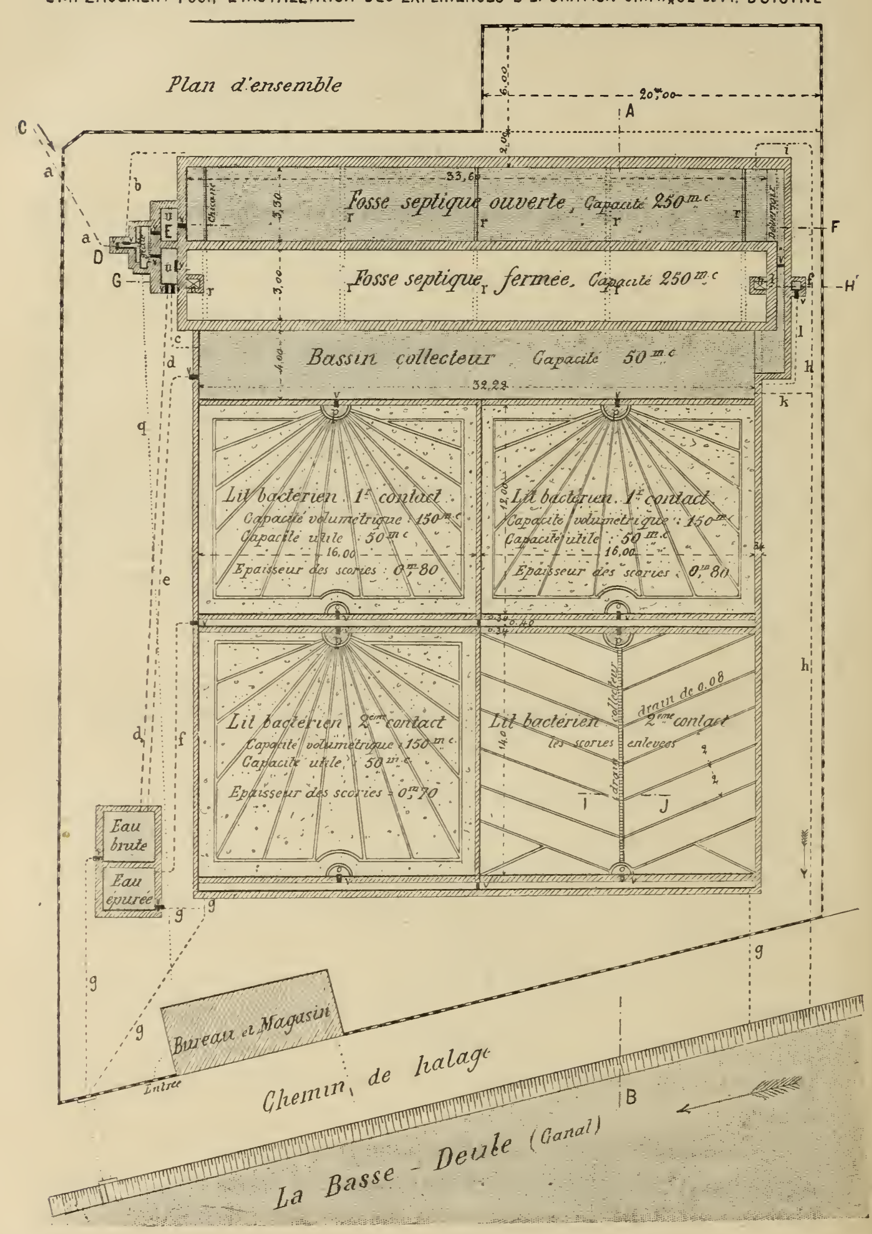
Épuration biologique appliquée aux eaux résiduaires industrielles.

En même temps que l'installation expérimentale de la Madeleine va permettre de réaliser sur une assez large échelle l'étude comparative des procédés biologiques, chimiques et chimico-bactériens appliqués à la même eau d'égout et à la totalité des eaux résiduaires d'une petite ville de 12,500 habitants, j'ai outillé spécialement un des laboratoires de l'Institut Pasteur de Lille en vue des recherches à entreprendre sur l'épuration des eaux résiduaires de chacune des grandes industries de la région du Nord de la France et sur la biologie des microbes nitrificateurs[1].

Actuellement, les industries puissantes qui enrichissent cette région sont obligées de se débarrasser de leurs eaux usées en les rejetant dans les rivières ou les canaux : il en résulte des inconvénients de toutes sortes dont le plus grave, en dehors

1. Voir BOULLANGER, ces *Annales*, t. XVII, 1903, p. 492, et t. XVIII, 1904, p. 181.

EMPLACEMENT POUR L'INSTALLATION DES EXPÉRIENCES D'ÉPURATION CHIMIQUE DE M. BUISINE



Coupe suivant AB, du plan d'ensemble
(L'échelle est double pour les hauteurs)

Coupe suivant CDEF du plan d'ensemble
(L'échelle est double pour les hauteurs)

Coupe suivant GH du plan d'ensemble
(L'échelle est double pour les hauteurs.)

Drainage du fond des lits

Rigole à la surface des lits

Déversoir de jauge
Élévation — Coupe cd

Déversoir de trop plein
Élévation — Coupe ab

Coupe des scories des lits

Légende

a Conduite d'arrivée des eaux
b. — id — pour l'installation de M. Buisine
c — id — d'amenée des eaux brutes dans le collecteur, sans passer par les fosses septiques
d . — id — d'amenée des eaux dans le réservoir des eaux brutes
e — id — des eaux du collect^r dans le réserv^r des eaux br^tes
f — id — des eaux du 1^r contact — id — eaux épurées
g Conduite d'évacuation à la Deule
h — id — de trop plein
i . trop plein de la fosse septique ouverte .. j .. id .... fermée
l. tuyau d'amenée des eaux de la fosse septique fermée dans collect^r.
k trop plein du collecteur.
m .. Can^l d'am^ée des eaux de la fosse septiq^e ouverte dans le collect^r
n .. Regards au-dessus de la fosse septique fermée
o .. Protège-vanne
p .. Déversoir de distribution sur les lits
q Tube de l'appar^t enregist^r de débit des eaux épurées
r .... Chicanes de fond et de superficie dans les fosses septiques
s ... Tuyau d'évacuation des gaz de la fosse septique fermée.
t .. Chambre de la grille, du déversoir et de l'appar^t de jauge 2^m,00 × 1^m,00
u .... Chambres à sable avec chicane
v . Vannes de 0.25 d'ouverture

même de dangers pour la santé publique, est que les industries ne pourront bientôt plus trouver, dans les nappes souterraines polluées, assez d'eaux propres pour subvenir à leurs besoins.

Il était donc urgent d'aborder l'étude des moyens pratiques à proposer aux industriels pour leur permettre d'épurer leurs eaux usées, de manière à ce qu'ils puissent sans dommage, soit les rejeter dans les rivières, soit les utiliser de nouveau immédiatement.

A ce point de vue spécial, nous avons déjà obtenu des résultats très importants en ce qui concerne les eaux résiduaires de sucreries et celles d'amidonneries.

Nous avons entrepris pendant les deux dernières campagnes sucrières, avec la collaboration de MM. Leroux et Vié, ingénieurs, des essais d'épuration des eaux résiduaires de sucrerie à l'usine de la Société Say, à Pont-d'Ardres (Pas-de-Calais). Ces essais ont porté sur un volume d'environ 300 mètres cubes par jour.

Ils ont montré que les eaux résiduaires de sucrerie, que l'on rangeait jusqu'à ces derniers temps parmi les plus difficiles à épurer, sont parfaitement justiciables du système biologique, sous réserve de certaines modifications aux dispositifs habituellement employés pour les eaux d'égout.

Tout d'abord, il est indispensable de ne pas faire usage de fosses septiques avec ces eaux qui renferment presque exclusivement des matières hydrocarbonées telles que la cellulose, les matières pectiques et le sucre. L'emploi des fosses septiques aurait eu pour effet de développer des fermentations anaérobies *butyriques* et de donner naissance à des quantités considérables d'acide butyrique qui gênerait par la suite les actions oxydantes sur lits bactériens à cause de son pouvoir antiseptique relativement élevé.

D'autre part, les eaux de presses à cossettes de sucreries étant très concentrées et riches en sucres (elles renferment par litre 4 à 6 gr. de matières organiques dont $2^{gr}8$ à $3^{gr}2$ de sucre et 5 à 6 gr. de pulpes flottantes), il est nécessaire de les diluer avec un tiers ou une moitié d'eaux provenant du lavage des betteraves, qui contiennent une quantité très grande de microbes du sol et qui facilitent puissamment l'action oxydante des lits bactériens.

On reçoit donc directement et successivement les eaux de presses à cossettes diluées sur une série de 3 lits bactériens aérobies. Elles séjournent 2 heures sur chaque lit et sortent du dernier contact sans trace de sucre. Le pourcentage de l'épuration totale sur chaque lit s'élève progressivement à :

30 0/0 après le premier contact ;

65 0/0 après le deuxième contact ;

90 0/0 et jusqu'à 92 0/0 après le troisième.

L'eau épurée n'est ni putrescible ni toxique pour les poissons, alors que ces derniers succombent presque instantanément quand on les plonge dans l'eau brute.

M. G. Barrois-Brame, fabricant de sucre à Marquillies (Nord), a bien voulu, lui aussi, essayer l'épuration bactérienne de ses eaux de presses à cossettes pendant la dernière campagne sucrière. Il a employé, pour cette expérience, trois bacs en tôle, de 5 mètres cubes environ de capacité chacun, surélevés en cascade au-dessus du sol. Au fond de chacun d'eux, on a disposé des drains et, au-dessus de ceux-ci, une couche de 1 mètre d'épaisseur de mâchefer.

J'ai fait laver les scories une fois par jour pendant une semaine avec de la délayure de terre arable, pour provoquer une multiplication plus rapide des microbes oxydants. On y a admis ensuite les eaux des presses à cossettes, d'abord diluées aux 2/3 avec de l'eau de lavage de betteraves, puis diluées à 1/2, puis diluées à 1/3. Les résultats ont été identiques à ceux obtenus à la sucrerie de Pont-d'Ardres.

On peut donc considérer comme résolu le problème de l'épuration des eaux résiduaires des sucreries.

Nous entreprendrons ainsi successivement avec le concours d'industriels éclairés de la région du Nord, l'étude des meilleurs systèmes à employer dans les diverses industries, et nous publierons tous nos résultats d'expériences à mesure qu'ils nous paraîtront pouvoir servir de base à des applications définitives.

Nous espérons de la sorte, mes collaborateurs et moi, contribuer utilement aux progrès de nos connaissances sur l'assainissement des industries et des villes, et nous nous efforcerons de justifier la confiance que le Conseil d'administration de la Caisse des recherches scientifiques veut bien nous témoigner en nous accordant les moyens de poursuivre nos travaux.

L'Infection mixte dans la tuberculose chirurgicale

PAR LE Dr N. PETROFF (DE St PETERSBOURG)

Travail du laboratoire du professeur Metchnikoff

Le rôle important des associations microbiennes dans la tuberculose chirurgicale n'est plus méconnu de nos jours.

L'expérience journalière des chirurgiens, ainsi que plusieurs travaux de laboratoire, semblent avoir démontré que les foyers tuberculeux fermés et ouverts ont un pronostic très différent, que les divers microbes de l'infection secondaire exercent une influence considérable sur l'évolution même de la tuberculose. Mais, à part ces grands principes, on aurait de la peine à trouver un point important de cette intéressante question qui fût appuyé par des faits assez nombreux et bien établis pour ne pas donner lieu à des affirmations sensiblement divergentes.

Ainsi, pour ce qui concerne le contenu des foyers ouverts de tuberculose chirurgicale, les analyses bactériologiques, plutôt rares, ont été preque toujours exécutées pour ainsi dire en passant, au courant de différentes recherches, dont elles ne présentaient pas le but principal. (Babes, Pawlowsky, Verneuil et Béretta, Dor, Pasquale, Lannelongue et Achard.)

Pour les foyers fermés, les recherches ont été plus exactes (Garré, Hoffa, Lannelongue et Achard, Krompecher u. Zimmermann) et leurs résultats, à peu près identiques pour tous, permettaient d'affirmer l'absence de microbes associés dans l'immense majorité de ces foyers. Pourtant, dans une étude récente, V. Brunn serait parvenu à cultiver des streptocoques de 39 abcès froids suppurés, dans des cas d'adénites tuberculeuses du cou sans commnnication extérieure.

Voilà donc l'incertitude revenue dans ce domaine.

L'étude expérimentale de l'influence des associations microbiennes sur la tuberculose, inaugurée par Baumgarten en 1884, fut reprise par Pawlowsky, Prudden, Arloing et Nicolas, Ramond et Ravaut, Sata et Michelazzi.

Les auteurs ne sont pas unanimes à reconnaître la nocivité

de ces associations pour l'organisme. Selon Sata, une association de staphylocoques ou de streptocoques peu virulents pourrait même stimuler les forces de défense de l'organisme et prolonger sa lutte contre le mal envahissant (p. 142 et 170).

Des conditions comparables à la tuberculose chirurgicale humaine à infection secondaire furent créées par Pawlowsky et Ramond et Ravaut. Les expériences de ces auteurs semblent avoir démontré l'influence favorisante de l'infection mixte sur la marche du processus tuberculeux local et sur sa généralisation dans l'organisme. Seulement, les expériences de P. sont trop peu nombreuses (3 avec 1 témoin), quant à celles de R. et R., elles se rapportent à des injections répétées de microbes absolument dépourvus de virulence dans des foyers préalablement tuberculisés avec un mélange de bacilles tuberculeux et de ces mêmes microbes. Les résultats obtenus par ces auteurs sont relatés en termes très sommaires.

De nouvelles recherches sur la bactériologie des foyers ouverts et celle des foyers fermés et aussi une étude expérimentale furent entreprises par moi sur les avis et conseils de M. Metchnikoff.

Le matériel pour la presque totalité de mes recherches bactériologiques a été fourni par des malades du service du professeur Lannelongue à l'hôpital des Enfants malades. Le pus des abcès froids osseux, articulaires et ganglionnaires, prélevé au cours des opérations dans des pipettes stériles, fut ensemencé dans plusieurs tubes de gélose glycérinée, où il fut réparti sur toute la surface du milieu après dilution dans l'eau de condensation. Les restes de pus furent employés à faire des frottis sur lames, examinés après coloration.

Les analyses de pus d'abcès ouverts comprennent 44 cas, dont trois seulement ne donnèrent aucun développement dans les milieux de culture. Dans ces cas-là, l'ensemencement ne put être réalisé qu'avec des quantités trop insignifiantes de pus. Les autres 41 cas donnèrent des colonies. Toutes les espèces microbiennes, arrivées au développement, furent isolées, et leur diagnostic précis fut obtenu à l'aide de cultures sur les différents milieux, souvent complétées par l'inoculation à des animaux.

23 fois nous rencontrâmes des staphylocoques (16 blancs,

6 dorés et 1 citrin), 18 fois des streptocoques, 8 fois des bacilles pseudo-diphtériques, 4 fois du bacille pyocyanique, 2 fois du tétragène, autant de sarcines, 1 fois le *bactérium coli* et encore plusieurs espèces saprophytes, dont nous ne pûmes déterminer la nature.

On voit que la fréquence relative des principaux microbes pyogènes dans les abcès froids ouverts correspond parfaitement à celle qui est observée dans les suppurations aiguës des mêmes régions. En effet, la grande statistique de Jakowski sur la bactériologie des suppurations aiguës, basée sur 827 cas, compte 605 cas de staphylocoques et 154 de streptocoques.

Afin d'élucider les rapports existant entre les microbes de l'infection secondaire et les tissus des abcès froids qui les contiennent, nous exécutâmes une série de recherches histologiques. A cet effet, des fragments de granulations, de membranes synoviales ou autres particules de la paroi des abcès, enlevées au cours des opérations, furent fixées par l'alcool, incluses dans la paraffine, divisées en coupes et étudiées après différentes colorations, propres à mettre en évidence les bactéries (méthodes de Ziehl, de Gram, bleu de Löffler, thionine). Or, parmi les 27 cas ainsi examinés, il ne s'en trouva qu'un seul (péritonite tuberculeuse ouverte, examen des fausses membranes), où les tissus continssent des amas de bactéries (staphylocoques), entourés de foyers nécrobiotiques, dus à leur présence.

Dans la totalité des autres cas, il nous fut impossible de démontrer la présence de microbes dans les tissus; tout au plus s'il s'en trouvait de petits groupes isolés, situés au voisinage immédiat de la surface et n'ayant provoqué aucune réaction appréciable de la part des tissus environnants. Et pourtant, plusieurs de ces cas présentaient des signes d'acuité très prononcés et parfois avaient même provoqué des symptômes généraux d'infection pyogène. Notamment dans un cas de tuberculose du pied, ouverte et très enflammée, ayant nécessité l'amputation, un examen très minutieux des coupes de la synoviale (articulation tibiotarsienne) ne réussit pas à démontrer la présence de microbes dans l'épaisseur des tissus; cette synoviale baignait littéralement dans le pus contenant une association de staphylocoques, de streptocoques et de bacilles pyocyaniques.

Ceci nous porte à conclure que dans les foyers ouverts de

tuberculose chirurgicale, les microbes de l'infection secondaire, démontrés par l'ensemencement du pus, ne résident que rarement dans la profondeur des tissus en quantité notable.

Toutes les préparations examinées contenaient des tubercules typiques, mais les bacilles tuberculeux ne purent être mis en évidence que deux fois sur 27.

Si nous passons maintenant aux foyers fermés, nous nous trouvons en présence d'analyses bactériologiques portant sur 57 cas.

Autant que possible, la quantité de pus ensemencée fut considérable, 1/2 c. c. et au delà; tous les pus des abcès fermés furent soumis à la culture aérobie (sur gélose glycérinée) et anaérobie, après évacuation de l'air (sur gélose sucrée).

Parmi les 57 cas mentionnés, 49 ne donnèrent lieu à aucun développement de germes. 7 d'entre eux présentaient des signes locaux d'acuité et 3 avaient causé en outre une réaction fébrile générale.

Des faits analogues ont déjà attiré l'attention de Lan. et Ach., et d'autre part Koch a signalé l'apparition d'abcès stériles après l'introduction de bacilles tuberculeux tués (en suspension dans sa 2e tuberculine) dans le tissu sous-cutané de l'homme.

L'injection dans les articulations de deux lapins, d'une émulsion de bacilles tuberculeux, détruits par la chaleur, m'a permis également d'assister à l'évolution d'arthrites, franchement aiguës au début et dont le pus ne fut pas cultivable.

Nous voyons donc que les données de la bactériologie clinique, ainsi que les résultats de l'expérimentation poussent à conclure que les bacilles tuberculeux sont capables — de par l'action des produits élaborés pendant leur vie, ou provenant de la destruction de leurs corps — de produire des poussées inflammatoires aiguës sans la concurrence de microbes associés quelconques.

Les résultats positifs des cultures de pus d'abcès froids fermés sont au nombre de 8, (3 staphylocoques blancs, 2 streptocoques, 2 microcoques sans virulence et ne liquéfiant pas la gélatine, et un bacille saprophyte indéterminé).

Mais dans aucun de ces huit cas l'analyse bactériologique ne fut exempte de causes d'erreur. Les uns notamment avaient été ponctionnés dans un passé plus ou moins proche; les autres, intacts eux-mêmes, avoisinaient des trajets fistuleux et des

excoriations de la peau, ce qui rendait impossible le prélèvement stérile du pus des foyers en question. Ainsi nous ne réussîmes pas une seule fois à trouver des microbes associés dans des abcès froids fermés recouverts et entourés de peau saine.

Ce résultat, en conformité absolue avec les données de presque tous les auteurs, est en opposition avec les conclusions déjà mentionnées de V. Brunn. L'auteur allemand a trouvé des streptocoques dans la totalité de 39 adénites tuberculeuses suppurées du cou. Or, parmi nos cas d'abcès fermés, il y avait 11 adénites du cou, dont trois seulement contenaient des microbes et encore l'analyse en fut faite dans les conditions défectueuses ci-dessus indiquées; 2 de ces 11 adénites étaient en un état de colliquation très prononcé, et ne contenaient pas de germes cultivables.

Il est très probable que les résultats étonnants des recherches de V. Brunn sont dus à l'infection des ganglions cervicaux de ses malades par des microbes provenant de la cavité buccale (ce qu'il admet lui-même) grâce à des particularités dans l'état de cette cavité, ainsi que dans la nourriture des malades.

Les recherches bactériologiques ci-dessus exposées nous ayant fixé sur la nature et les particularités de l'infection mixte dans la tuberculose chirurgicale, nous entreprîmes l'étude expérimentale de la question.

A cette fin nous pratiquâmes l'infection artificielle des articulations du genou chez des lapins et ceci pour les raisons suivantes: 1° la tuberculose articulaire est l'une des formes les plus communes, souvent très graves, de cette maladie chez l'homme; 2° la présence de deux articulations homonymes chez chaque animal permet d'observer l'influence produite par l'infection secondaire sur l'une d'elles, pendant que l'autre reste purement tuberculeuse; 3° les articulations du genou de lapins offrent toutes les commodités pour le dosage exact des matières à inoculer.

Des inoculations de 1/3 de c. c. d'une émulsion de bacilles tuberculeux humains furent donc pratiquées sur deux séries d'animaux, dans les deux articulations du genou de chaque animal. Une partie des animaux, servant de témoins, fut abandonnée à elle-même, le reste fut soumis à une infection secondaire de l'un des genoux tuberculisés, par l'inoculation de

différents microbes : streptocoque, staphylocoque, bacille pyocyanique, *bacterium coli*, micrococue tétragène. Tous ces microbes, à l'exception du tétragène, provenaient de nos ensemencements de produits tuberculeux humains.

L'autopsie des animaux fut toujours suivie de l'excision des deux articulations malades, lesquelles furent fixées, décalcifiées, incluses dans de la celloïdine, divisées en coupes et examinées au microscope à faible grossissement.

Dans tous les cas où l'infection secondaire avait eu une durée assez prolongée (n°s 4, 6, 8, 12, 20 du tableau), cet examen révéla la présence de foyers de granulations et de destruction bien plus considérables dans les articulations infectées secondairement que dans celles qui étaient restées purement tuberculeuses. Notamment les cartilages et les épiphyses osseuses, faisant partie des articulations à infection double, étaient toujours attaquées par le processus destructif, tandis que dans les articulations à infection tuberculeuse pure ce n'étaient que les synoviales et les ligaments intra-articulaires, c'est-à-dire les tissus moins résistants, qui avaient souffert de la maladie.

L'examen bactériologique du pus des articulations à infection secondaire démontra, dans tous les cas, la présence du microbe respectif en culture pure.

Le tableau ci-dessous servira à exposer l'influence de l'infection secondaire sur la généralisation de la maladie.

On voit bien qu'une infection secondaire, associée à la tuberculose articulaire, accélère notablement la généralisation de la tuberculose primitive, qui se localise dans les poumons.

Cette accélération est due à deux causes : l'une, c'est l'affaiblissement de l'organisme, attaqué par une infection secondaire, l'autre, et probablement la plus importante, c'est le changement subit, apporté par l'infection secondaire à l'évolution de la tuberculose locale. Celle-ci, en effet, se déroulant lentement, laisse à l'organisme pleine faculté de créer, à l'aide d'un processus inflammatoire chronique, une barrière, un vrai rempart contre la propagation des bacilles tuberculeux; or l'association d'une infection aiguë et destructive produit des brèches dans ce rempart longuement constitué et les bacilles tuberculeux, entraînés par un courant libre de leucocytes,

gagnent le système circulatoire et se propagent dans l'organisme.

Les ganglions lymphatiques du fémur, de l'aine et autres, n'étaient pris dans aucun de nos cas et l'organe unique qui avait contracté la tuberculose était le poumon.

Ces faits se trouvent en parfaite conformité avec une série d'observations, recueillies dans ma thèse; leur nombre total, dépassant maintenant la cinquantaine, me paraît suffisant pour établir que la tuberculose articulaire se propage habituellement par la voie des vaisseaux sanguins et non par celle des vaisseaux lymphatiques, comme le prétendait Pawlowsky.

Les microbes de l'infection secondaire ne purent être retrouvés que deux fois à l'examen des frottis et des coupes des foyers tuberculeux pulmonaires; il paraît donc que, dans la majorité des cas, le bacille tuberculeux fut seul à se propager, l'infection secondaire restant localisée dans l'articulation.

Aucun symptôme, indiquant un avantage quelconque retiré par l'organisme du fait de l'association microbienne, ne se présenta à notre observation.

Les conclusions générales de mon travail sont les suivantes :

1° Les foyers fermés de tuberculose chirurgicale, n'ayant subi aucune intervention chirurgicale, recouverts et entourés de peau saine, ne contiennent pas, dans la grande majorité des cas, de microbes associés aérobies ou anaérobies. Ces foyers peuvent présenter des signes d'acuité très prononcés;

2° Les foyers ouverts de tuberculose chirurgicale contiennent toujours des microbes associés, qui sont pour la plupart des cocci pyogènes à faible virulence; ces derniers sont rares dans l'épaisseur des tissus;

3° Les associations microbiennes exaltent la destructivité de la tuberculose articulaire et accélèrent sa généralisation dans l'organisme. Le premier organe envahi par la tuberculose est le poumon; donc la généralisation suit le cours de la circulation sanguine. Les microbes associés ont une tendance beaucoup moindre à la propagation, tout en restant vivants dans les articulations inoculées;

4° Le fait clinique bien connu de la malignité plus considérable des formes ouvertes que des formes fermées de la tuber-

1re SÉRIE	POIDS des animaux lors de l'inf. tubercul.		POIDS lors de l'infec. secondaire.	NOMBRE des jours de survie à l'infection		CAUSE de la mort et poids des cadavres.		ÉTAT DES ORGANES INTERNES
				tubercul.	secondaire.			
Témoins	1.	1.700		27		Diarrhée...	1.420	Sans traces de tuberculose
	2.	1.720		23		Tué	1.360	
Inoculation second. de 1/15 c. c de culture du *bac. pyocyan.* dans 1 genou ..	3.	1.810	1.680	11	2	Septicémie .	1.470	Sans traces de tuberculose.
	4.	1.970	1.730	23	14	Tub. pulm.	1.550	Les deux poumons criblés de tubercules.
Inoculation second. de 1/24 c. c. de culture de *staphyl. blanc* dans 1 genou	5.	1.550	1.750	32	21	Tué	1.575	Tubercules nombreux dans les deux poumons.
	6.	1 510	1.820	33	22	Tué	1.825	Une dizaine de tuberc dans les deux poumons.
Inoculation second. de 1/20 c. c. de culture de *b coli*..................	7.	1.980	1.530	16	5	Diarrhée ..	1.360	Sans traces de tuberculose.
	8.	1.630	1.800	33	22	Tué	1.650	3-4 tuberc. solitaires et plusieurs miliaires dans les deux poumons.
2e SÉRIE								
Témoins	9.	1.345		15		Diarrhée...	1.260	Sans traces de tuberculose.
	10.	1.870		57		Tué	2.390	Poumon gauche sain, poumon droit contient un groupe de 3 petits tubercules.
	11	2 120		66		Tué	2 130	2 tuberc. solitaires et 4-5 miliaires dans les deux poum.
Inoculat. secondaire de 1/20 c. c. de culture sur bouillon de *bac. pyocyanique* dans 1 genou	12*	1.750	1.560	58	9	?..........	1.400	Poumon droit sain, poumon gauche contient 3-4 tubercules miliaires.
	13.	2.310	2.080	46	38	Tub. pulm.	1.630	Les deux poumons criblés de tubercules.
	14.	2.240	1 950	58	50	Tué	1.900	Plusieurs groupes de tuberc. solitaires aux centres caséeux, dans les deux poumons.
Inoculat. secondaire de 1/10 c. c. de culture sur bouillon de *streptocoques* dans 1 genou	15.	2.330	2.120	35	27	Tub. pulm.	1.420	Les deux poumons criblés de tubercules.
	16.	2.170	1.890	57	49	Tué	1.870	Les deux poumons contiennent des tubercules très nombreux.
Inoc. sec. de 1/20 c. c. de *staph. blanc* (cult. sur bouillon) dans 1 genou..	17.	2.550	2.450	18	10	Septicémie.	2.020	Pleuro-pneumonie septique des deux poumons; il est impossible de dire s'il existe ou non quelque tubercule dans les poumons.
	18.	2.500	1.780	27	19		1.670	
Inoculat. secondaire de 2/3 c. c. de *tétragène* dans 1 genou............	19.	2.095	1.770	66	49	Tués	2.460	Plusieurs groupes de tubercules solitaires et miliaires dans les deux poumons.
	20.	2.060	1.635	66	49		1.860	Plusieurs tubercules solitaires (2 3), et plus. miliaires dans les deux poumons.

* Cet animal, comme étant mort après 9 jours d'infection secondaire et 58 de tuberculeuse, pourrait être rangé parmi les témoins.

culose chirurgicale trouve une explication parfaitement suffisante dans l'infection secondaire.

Le traitement rationnel de ces formes ouvertes, ayant deux buts à atteindre : guérir le processus local et empêcher sa généralisation, doit donc toujours être guidé par l'idée maîtresse de l'aseptisation des foyers dans la mesure du possible.

BIBLIOGRAPHIE

Arloing et Nicolas, *De l'influence d'une infection streptococcique*..... (4e Congrès pour l'étude de la tuberculose, Paris, 1898.)

Babes, *Sur les associations microbiennes*..... (1er Congrès p. l'ét. de la tub., Paris, 1891.)

Baumgarten, Ueber die Uebertragung. (*Cbltf. Klin. Medic.*, 1884, no 2.)

V. Brunn, *Pathol.-anat. Arbeiten... Orth-gewidmet Gestschrift*, 1903.)

Dor, 2e Congrès p. l'étude de la tuberculose, Paris, 1893.

Hoffa, Bakteriologische Mittheilungen. (*Fortschritte der Medicin*, 1886, no 3.)

Parré, Zur Aetiologie der kalten Abscesse. (*Deut. Med. Woch.*, 1886, no 34.)

Jakowski, Die Ursachen der Eiterung. (*Ziegler's Beiträge*, 1894, Bd. XV.)

Koch, Ueber neue Tuberkulinpräparate. (*D. Med. Woch.*, 1897, no 14.)

Krompecher u. Zimmermann, Untersuchungen über die Virulenz..... (*Cblt f. Bakter*, 1903, XXXIII, no 8.)

Lannelongue et Achard, Associations microbiennes..... (*C. R. de l'Acad. des Sciences*, no 122, 1896.)

Michelazzi, Intorno all' influenza..... (*Riforma medica*, 1902, no 239-42.)

Pasquale, Refer..... (*Cblt. f. Bakter.*, 1894.)

Pawlowsky, Sur les formes mixtes de la tuberculose des articulations..... (*Annales Pasteur*, 1889.)

Pawlowsky, Sur l'histoire du développement..... (*Ann. Past.*, 1892.)

Pétroff, *Thèse de Saint-Pétersbourg*, pages 94-96, 1902. (En russe.)

Prudden, Concurrent infections and the formation of cavities. (*New-York Med. Journ.*, 1894, vol. LX, july 7.)

Ramond et Ravaut, Action des microbes..... (*Arch. de Med. expér.*, 1899.)

Sata, *Ueber die Bedentung der Mischinfection*..... Iéna 1899.

Verneuil et Béretta, *Influence des associations microbiennes*..... (1er Congrès pour l'étude de la tuberc., Paris, 1891.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ORIGINE DES ANTICORPS[1]

Les Anticorps contre les spirilles de la septicémie des poules.

PAR LE D[r] C. LEVADITI.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

L'importance des études concernant l'origine des anticorps n'est plus à discuter. Ces études, précisant quel est l'organe ou la catégorie cellulaire qui, chez les animaux immunisés, se charge d'élaborer les substances spécifiques des *immun-sera*, permettent de pénétrer plus intimement le mécanisme qui préside à la fabrication de ces substances. Or, on est encore loin d'être d'accord sur la nature de ce mécanisme, qui varie suivant les diverses théories de l'immunité.

Si le lieu d'origine des antitoxines, étant donnée la difficulté du problème, est relativement peu précisé, celui des précipitines a été récemment déterminé d'une façon certaine par MM. Kraus et Levaditi[2]. Ces auteurs ont prouvé que les leucocytes qui absorbent les principes protéiques d'espèce étrangère, injectés dans la cavité péritonéale, s'accumulent dans l'épiploon, où ils élaborent des précipitines capables d'agir d'une façon spécifique sur ces albumines.

Mais c'est surtout l'origine des anticorps bactériolytiques qui est mieux précisée à l'heure actuelle. Pfeiffer et Marx[3] ont été les premiers à déterminer cette origine pour les bactériolysines anticholériques. Leurs recherches, restées classiques, ont prouvé que de tous les organes provenant des lapins immunisés contre le vibrion cholérique, les leucocytes du sang y compris, seuls la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques, interviennent d'une façon active dans la production des choléra-

1. Ce travail fait partie d'une série de recherches que Kraus et Levaditi se sont proposé d'entreprendre dans le but de préciser le rôle des leucocytes dans la production des anticorps.

2. Kraus et Levaditi, *C. R. de l'Acad. des Sciences*, séance du 5 avril 1904.

3. Pfeiffer et Marx, *Zft. für Hygiene*, vol. XXVII, 1898, p. 272.

anticorps. D'un autre côté, M. Wassermann, dans une série d'études concernant la production des substances immunisantes contre le b. typhique [1] et le pneumocoque [2], a démontré que si le sang, le cerveau, la moelle épinière, les muscles, le foie et le rein se montrent presque dépourvus de qualités préventives, par contre ces qualités apparaissent d'une façon frappante dans le thymus, la rate et surtout la moelle osseuse. Enfin, à cet ordre de recherches se rattachent les constatations de Deutsch [3], d'après lesquelles la rate doit être considérée comme une source principale d'anticorps, chez les lapins immunisés contre le bacille typhique.

Il résulte de ces observations que les organes qui produisent les substances actives des immun-sera sont le thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate. Ces organes sont reliés entre eux par un trait commun, la leucopoïèse, et ce fait, dont l'importance ne saurait être méconnue, conduit à penser que le système leucocytaire est le véritable producteur des anticorps bactériolytiques. C'est là l'interprétation la plus simple des résultats recueillis par les auteurs cités. Néanmoins, pour des motifs que nous aurons à examiner au cours de ce mémoire, cette interprétation n'est pas acceptée d'une façon unanime par les savants qui se sont occupés de cette question.

II

Les recherches qui font le sujet de ce travail ont été entreprises avec le spirille décrit récemment par Marchoux et Salimbeni [4], et étudié au point de vue du mécanisme de la crise, par nous-même [5]. On savait, depuis les constatations de Metchnikoff, de Sawtchenko [6] et de Marchoux [7] que l'injection à des mammifères (lapin et cobaye) de sang d'oiseaux riche en spirilles (spirille de Sacharoff, spirille de Marchoux et Salimbeni), est rapidement suivie d'une formation d'anticorps spécifiques [8]. Ces anticorps manifestent leur action élective sur les spiro-

1. A. Wassermann, *Berl. kl. Woch*, 1898, n° 10, p. 209.
2. A. Wassermann, *Deutsche med. Woch*, 1899, n° 9, p. 141.
3. L. Deutsch, *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, p. 689.
4. Marchoux et Salimbeni. Ces *Annales*, vol. XVII, 1903, p. 569.
5. Levaditi, Ces *Annales*, vol. XVIII, 1904, p. 129.
6. Sawtchenko, *Arch. russes de Pathol.*, 1900, p. 573.
7. Marchoux, communication orale.
8. Ces anticorps sont identiques à ceux découverts par Gabritchewsky dans le sang des oies infectées par le spirille de Sacharoff.

Tableau n° I.

ORGANE	LAPIN TÉMOIN		LAPIN 35. LE 3e JOUR		LAPIN 88. LE 5e JOUR		LAPIN 32. LE 7e JOUR	
	Mobilité.	bact.[1] *in vivo.*	Mobilité.	bact. *in vivo.*	Mobilité.	bact. *in vivo.*	Mobilité.	bact. *in vivo.*
Foie.	Mobiles.	+ le 7e j.	Mobiles.	+ le 4e j.	Mobiles.	+ le 6e j.	Mobiles.	+ le 6e j.
Rein.	Mobiles.	+ le 8e j.	Mobiles.	—	Mobiles.	+ le 6e j.	Mobiles.	+ le 7e j.
Ganglions.[2]	Mobiles.	+ le 7e j.	Mobiles.	+ le 4e j.	?	+ le 5e j.	Mobiles.	+ le 6e j.
Rate.	Mobiles.	+ le 5e j.	Mobiles.	+ le 4e j.	Mobiles.	+ le 6e j.	*Immob.*	+ le 5e j.
Epiploon.	Mobiles.	+ le 7e j.	Mobiles.	+ le 7e j.	Mobiles.	+ le 7e j.	*Part. Immob.*	+ le 2e j.
Sérum.	Mobiles.	+ le 7e j.	Mobiles. faibl. aggl.	+ le 6e j.	?	O	*Immob.*	O

1. + signifie mort ; O signifie survie sans infection.
2. Pancreas Asseli.

chètes, soit en immobilisant ces vibrions, soit en conférant une immunité passive aux animaux sensibles à l'égard de la septicémie spirillique. Il nous a semblé intéressant d'étudier le lieu de formation de ces anticorps, dans l'organisme du lapin vacciné contre les spirilles de la septicémie brésilienne et, pour ce faire, nous avons procédé de la façon suivante :

Méthode. — Plusieurs lapins du même poids recevaient dans le péritoine de 15 à 25 c. c. de sang riche en spirilles, provenant d'une poule sacrifiée au 3e jour de l'infection. Quelque temps après l'inoculation, on saignait à blanc ces lapins et on prélevait les divers organes pour la préparation des extraits. Ces extraits étaient obtenus en triturant les organes avec de la poudre de verre dans des mortiers stériles, en émulsionnant la bouillie cellulaire dans de l'eau salée à 8 p. 0/00, et en laissant macérer ces mélanges à 38° pendant 2 à 3 heures[1]. A la fin de l'opération et après décantation, on filtrait les liquides à travers du papier, et on obtenait ainsi des produits clairs, ne renfermant que très peu de débris cellulaires.

Le *pouvoir immobilisant* de ces extraits d'organes vis-à-vis des spirilles, était apprécié en mélangeant des quantités variables de liquide actif, à une dose donnée de sang spirillé (d'habitude 4 gouttes). L'observation microscopique avait lieu après une heure et demie de contact à 38°. D'un autre côté, on examinait la *virulence* des spirilles ayant subi l'influence des extraits d'organe, en injectant les mélanges de ces extraits et de spirochètes à des dominos, des capucins et des petits poussins.

RÉSULTATS OBTENUS

Série A, expériences I, II et III.

3 lapins ayant reçu dans la cavité péritonéale 25 c. c. de sang spirillé sont sacrifiés le 3e, le 5e et le 7e jour. On apprécie le pouvoir immobilisant des extraits d'organes et du sérum provenant de ces lapins et d'animaux témoins ; on détermine en même temps le pouvoir bactéricide *in vivo* de ces extraits, en se servant de capucins (v. tableau n° 1).

Cette expérience permet de tirer les conclusions suivantes :

1° Le 3e jour, aucune formation d'anticorps n'a eu lieu dans les organes et le sérum des lapins sacrifiés.

2° Le 7e jour, l'extrait de *rate* immobilisait les spirilles, et il en était de même, quoique à un plus faible degré, de l'extrait d'*épiploon*.

3° Le 5e et le 7e jour, le sérum entravait l'apparition de la maladie chez les oiseaux inoculés, cela à un moment où aucun

1. L'émulsion était faite dans une proportion de 10 gr. d'organe pour 100 c. c. de solution salée.

des organes examinés ne montrait la moindre propriété bactéricide appréciée *in vivo*.

Si ces résultats prouvent que la rate et l'épiploon peuvent être considérés jusqu'à un certain point comme un dépôt, sinon comme une source d'*immobilisines*, ils ne tranchent nullement la question de l'origine des principes bactériolytiques du sérum. A l'encontre de ce sérum, aucun des organes étudiés n'a fourni des extraits capables de sauver la vie des animaux qui recevaient en injection sous-cutanée, le mélange de virus et d'extrait. Après quelques tâtonnements, nous nous sommes aperçus que notre dispositif expérimental était insuffisant, et dans la suite, nous avons pu éviter la cause d'erreur qui rendait peu démonstratifs les résultats obtenus. Nous avons constaté, en effet, que si les extraits des organes leucopoïétiques (rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques), employés tels que, étaient dépourvus de qualités immobilisantes et microbicides à l'égard des spirilles, malgré leur richesse en anticorps, cela tenait au fait que ces extraits manquaient presque complètement de cytase (complément). *Faute de cytase, la sensibilisatrice contenue dans ces extraits, était incapable d'exercer son action spécifique sur les spirilles*, comme il résulte des expériences suivantes :

Série B, Expériences IV, V et VI.

3 lapins reçoivent dans la cavité péritonéale 20 c. c. de sang riche en spirilles. Ils sont sacrifiés le 2e, le 3e et le 5e jour. On apprécie le pouvoir immobilisant du sérum et des extraits d'organes, en présence du complément de lapin (v. tableau no II).

Il résulte de cette expérience que 5 jours après l'inoculation du sang riche en spirilles, *la rate, les ganglions lymphatiques, l'épiploon et la moelle osseuse,* à l'encontre du foie et du rein, renferment une quantité suffisante de sensibilisatrice, pour provoquer l'immobilisation des spirochètes, en présence de la cytase de lapin. Par contre, le 2e et le 3e jour, l'ambocepteur est absent dans les extraits de ces organes.

Tableau n° II.

ORGANES	EXTRAIT ou SÉRUM	CYTASE	LAPIN N° 30. Le 2e jour.	LAPIN N° 60. Le 3e jour.	LAPIN N° 90. Le 6e jour.
Foie.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.
		0,25			
		0			
Rein.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.
		0,25			
		0			
Rate.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles.
		0,25			Immobiles.
		0			Mobiles.
Ganglions.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles.
		0,25			Immobiles.
		0			Mobiles.
Moelle osseuse.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles.
		0,25			Immobiles.
		0			Mobiles.
Epiploon.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles.
		0,25			Immobiles.
		0			Mobiles.
Sérum au 10e.	2,0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles.
		0,25			
		0			
Cytase.	0	0,5	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.
		0,25			
Contrôle.	0	0	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.

Série C, expériences VII, VIII, IX et X.

Dans une autre série d'expériences, 4 lapins reçoivent en injection intrapéritonéale 20 c. c. de sang riche en spirilles ; ils sont sacrifiés le 3e, le 4e, le 7e et le 8e jour. Nous ne reproduisons ici que les résultats qui concernent les propriétés spirillicides des extraits d'organes et du sérum, appréciées *in vivo.* (Injection des mélanges à des jeunes poussins, à la dose de 1,5 c. c. (v. tableau n° III).

TABLEAU N° III.

2,0 EXTRAIT + 0,5 CYTASE	LAPIN 32. Le 2e jour.	LAPIN 41. Le 5e jour.	LAPIN 80. Le 7e jour.	LAPIN 91. Le 8e jour.
Foie.	+ le 7e jour.	Infect. grave [1]. Crise le 5e jour.	+ le 4e jour.	+ le 8e jour.
Rein.	+ le 6e jour.	+ le 8e jour.	Crise le 5e jour. Infection grave.	+ le 4e jour.
Muscles.	—	—	+ le 5e jour.	Crise le 5e jour.
Rate.	+ le 5e jour.	+ le 7e jour.	0	0
Ganglions.	—	+ le 5e jour. Infection légère.	Infection légère. Crise le 7e jour.	—
Moelle osseuse.	+ le 5e jour.	0	+ le 8e jour.	0
Epiploon.	—	0	+ le 6e jour.	+ le 8e jour.
Sérum au 10e	+ le 5e jour.	0	0	0
Cytase seule.	+ le 3e jour.	+ le 6e jour.	+ le 5e jour.	+ le 6e jour.

Ce tableau, ainsi que le protocole concernant le pouvoir immobilisant des extraits d'organes, permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° Les *immobilisines* font leur apparition dans les extraits préparés avec les organes hématopoïétiques (rate, moelle osseuse et ganglions) et l'épiploon, quatre jours après l'injection des spirilles. Par contre, les tissus témoins (foie, rein et muscle) sont dépourvus de principes actifs, ou n'en renferment que des traces, cela surtout chez les lapins sacrifiés à une période tardive de l'immunisation ;

2° Le pouvoir microbicide des extraits d'organes hématopoïétiques, apprécié *in vivo*, est nul au 2e jour, et n'apparaît d'une façon frappante dans la *rate* (lapins n° 80 et 91), la *moelle*

1. Nous désignons sous le terme d'*infection grave*, les cas où la quantité des spirilles du sang était considérable ; *infection légère*, signifie que l'apparition des spirochètes dans le sang a été tardive et le nombre des vibrions relativement faible.

osseuse (lapins n° 41 et 91) et l'*épiploon* (lapin n° 41) que plus tard. A ce moment, les extraits des organes témoins se montrent entièrement inactifs;

3° L'influence de la cytase ressort d'une façon très manifeste de ces recherches. Ainsi, la plupart des organes hémato-poïétiques immobilisent rapidement les spirilles en présence de la cytase de lapin et cependant ces organes se montrent sans action si on les emploie tels quels. La moelle osseuse de lapin 91, sacrifié le 8e jour, fait seule exception, en ce sens qu'elle arrête les mouvements des spirilles même en l'absence du complément. Mais cela s'explique, si l'on tient compte du fait que cette moelle, qui provient d'un animal immunisé depuis longtemps, renferme une quantité relativement considérable de sensibilisatrice, capable d'être réactivée par le peu de cytase que contient l'extrait de ce tissu médullaire.

III

L'ensemble de ces constatations prouve d'une façon non douteuse, que *seuls les organes leucopoïétiques fournissent des extraits capables d'immobiliser les spirilles en présence de la cytase, et de préserver la vie des animaux sensibles à la septicémie brésilienne.* Par contre, les tissus qui n'ont aucune relation avec la leucopoïèse, sont totalement dépourvus de propriétés microbicides. On est ainsi conduit à penser que ces organes sont, chez les organismes activement immunisés, une source principale d'anticorps, en ce sens qu'ils sécrètent ces anticorps et les déversent dans le plasma sanguin. Néanmoins, le fait que, dans ces recherches, le sérum des lapins dont les tissus leucopoïétiques renfermaient la sensibilisatrice spirillicide, était également pourvu de propriétés immunisantes, n'est pas sans soulever certaines objections contre cette interprétation. On peut se demander, en effet, si la présence de l'ambocepteur dans les extraits actifs, ne doit pas être attribuée aux traces de sang qui restent dans les organes après la saignée toujours incomplète, des animaux en expérience. Il suffit pourtant de considérer de plus près les conditions où nous avons opéré, pour s'apercevoir que cette objection est dénuée de fondement et qu'elle peut être facilement écartée.

Tout d'abord, en procédant comme nous l'avons fait, il arrive que certains lapins immunisés soient sacrifiés à un moment où les organes leucopoïétiques renferment des anticorps actifs, cependant que le sérum sanguin en est entièrement dépourvu. Voici un exemple de ce genre.

Expérience XI. — Un lapin reçoit dans le péritoine 25 c.c. de sang de poule, riche en spirilles. Il est sacrifié le 4e jour après l'injection. On apprécie le pouvoir microbicide *in vivo* des extraits d'organes et du sérum, en présence de cytase de lapin (injection à des jeunes poussins).

TABLEAU IV.

ORGANES	MOBILITÉ	RÉSULTATS
Foie.	Part. mobiles.	Infection assez grave.
Moelle osseuse.	Immobiles.	0
Ganglions.	Immobiles.	+ le 7e jour.
Rate.	Immobiles.	Crise le 9e jour.
Epiploon.	Immobiles.	+ le 6e jour.
Sérum au 10e.	Immobiles.	+ le 9e jour (crise).
Complément.	Mobiles.	+ le 4e jour.
Témoin.	Mobiles.	—

Quoique relativement rare, cette observation est précieuse, puisqu'elle montre que la moelle osseuse peut contenir des anticorps capables d'exercer leur action dans l'organisme vivant, à un moment où le sérum est inactif; elle prouve ainsi que *le tissu myéloïde est non seulement un dépôt, mais aussi une source de principes immunisants.*

D'ailleurs, il est aisé de s'apercevoir à la lecture de nos protocoles, qu'il n'existe nul rapport entre la richesse des divers

tissus en sang et leur teneur en sensibilisatrice spirillolytique. Ainsi, le foie est un organe dont la circulation capillaire est des plus développée et qui forme une sorte d'éponge d'où il est très difficile de retirer entièrement le liquide hématique. Or, le pouvoir immobilisant et microbicide de l'extrait de glande hépatique est nul, ou à peu près. D'autre part, on ne saurait trouver d'organe plus pauvre en sang que les ganglions lymphatiques et surtout l'épiploon, et cependant ces organes se sont montrés plus d'une fois actifs au cours de nos recherches. Enfin, l'objection dont nous avons parlé, tombe devant le fait que les extraits des organes leucopoïétiques contiennent la sensibilisatrice et non pas la cytase. Or, si le pouvoir immobilisant et bactériolytique de ces extraits était effectivement dû à leur teneur en sang, les deux principes constitutifs des immum-sera, la cytase et la sensibilisatrice, devraient exister simultanément dans les sucs de ces organes.

Force est donc d'admettre que les tissus dont la fonction principale est la production des globules blancs, sont à la fois une source active et un dépôt d'anticorps, et que les substances spécifiques des sérums immunisants proviennent de ces organes. Il y a lieu également de supposer que *les tissus leucopoïétiques déversent rapidement dans le plasma les anticorps qu'ils fabriquent* puisque le sérum sanguin acquiert, peu de temps après le début de l'immunisation, des qualités immobilisantes et thérapeutiques.

La question est de savoir laquelle des diverses espèces cellulaires qui entrent dans la constitution des organes hématopoïétiques, intervient d'une façon active dans la production des anticorps spirilliques. Il faut exclure le tissu conjonctif qui forme le stroma de ces organes, pour le motif que ce tissu est répandu d'une façon uniforme dans tout l'organisme et qu'il existe abondamment dans le foie et le rein, organes qui ne produisent pas d'anticorps. Restent les hématies et les globules blancs. Pour ce qui concerne la première de ces deux catégories de cellules, il y a lieu de remarquer qu'elle n'est pas représentée dans *tous* les tissus hématopoïétiques que nous avons étudiés. Ainsi, si la moelle osseuse produit un grand nombre de normoblastes, les ganglions lymphatiques et surtout la rate ne deviennent une source d'hématies nucléées,

chez les animaux adultes, que dans des conditions pathologiques exceptionnelles (Dominici). Par contre, les leucocytes forment la vraie base histologique de tous les tissus dont les extraits se sont montrés riches en anticorps. La moelle osseuse, comme il résulte des études d'Ehrlich[1] et de ses élèves, de Hirschfeld[2], de Naegeli[3] etc., renferme toute la série de cellules blanches granulées, depuis le myéloblaste et le myélocyte, jnsqu'au polynucléaire adulte du sang. Les ganglions sont, d'autre part, le lieu d'origine de la série lymphatique des globules blancs. Enfin, la rate, par ses follicules, engendre une partie des lymphocytes, et par cette intéressante propriété de retourner à l'état embryonnaire sous l'influence de certains agents infectieux, propriété entrevue par Arnold et bien étudiée par Dominici[4], se rattache intimement aux organes producteurs de leucocytes granulés.

L'épiploon occupe une place spéciale parmi les organes producteurs d'anticorps. Ce tissu n'est pas un formateur de globules blancs chez les animaux adultes, et le fait qu'il n'est pas moins une source d'anticorps (v. tabl. III, lap. n° 41), semble au premier abord venir à l'encontre de l'origine leucocytaire de ces anticorps. Pourtant, l'examen microscopique pratiqué dans les circonstances les plus variées, telles que l'injection intra-péritonéale d'hématies, de microbes ou d'albumines étrangères (Kraus et Levaditi), montre que si l'épiploon n'est pas une source de globules blancs, il n'en devient pas moins un dépôt important. En effet, les leucocytes qui peuplent la cavité péritonéale à la suite de ces injections, ne tardent pas à s'accumuler dans les mailles lymphatiques de cet épiploon, d'où le lavage ne réussit à les retirer qu'avec peine. Nous avons pu vérifier la réalité de ce fait chez nos lapins immunisés, dont l'épiploon était, peu de temps après l'introduction du sang spirillique dans le péritoine, farci de globules blancs polynucléaires et de macrophages.

Il résulte donc que le seul trait commun qui ressort de l'étude histologique des organes producteurs d'anticorps,

1. Ehrlich, *Die Anaemie*, Pathol. de Nothnagel, Vienne 1900. Voir pour les détails, Levaditi. *Le leucocyte et ses granulations*, Paris, Naud, 1902.
2. Hirschfeld, *Virch. Arch.*, vol. CLIII, 1898.
3. Naegeli, *Deutsche med. Wœh.*, n° 18, 1900.
4. Dominici, *Arch de med. experim.*, vol. XII, 1900.

est leur fonction leucopoïétique et la destinée qu'ils ont d'accumuler un grand nombre de globules blancs, d'être, pour ainsi dire, de vrais dépôts de leucocytes. D'où l'on doit conclure que *l'élément cellulaire qui représente dans ces organes la source principale de ces anticorps, n'est autre que le leucocyte.*

Ce qui, de plus, vient à l'appui de cette origine leucocytaire des anticorps, c'est la relation que l'on est forcé d'établir entre l'absorption des principes immunogènes (*antigènes* de Deutsch) et la formation de ces anticorps. La simple réflexion nous contraint d'admettre en effet, quelle qu'elle soit la théorie que l'on accepte, que la cellule qui produit l'anticorps doit être précisément celle qui absorbe la substance immunogène. Or, partout où on a analysé de près les procédés que l'organisme emploie pour résorber les corps immunisants solides (microbes ou cellules), on a reconnu que ces procédés relèvent de l'intervention des phagocytes. Ainsi, sans insister sur ce qui se passe dans la cavité péritonéale, où l'on voit les polynucléaires englober les microbes vivants ou morts, et les macrophages présider à la résorption des cellules, nous rappelerons seulement les processus de même ordre qui s'opèrent dans l'intimité des organes. Nous avons pu établir, par exemple, que l'injection d'hématies de pigeon dans la circulation générale du cobaye, est rapidement suivie de l'englobement de ces hématies par les macrophages de la rate, englobement qui peut être complet déjà au bout d'une heure[1]. D'un autre côté, nous avons pu constater, pour ce qui concerne le cas particulier des spirilles, que ces microorganismes deviennent, chez la poule, la proie des phagocytes spléniques et médullaires pendant l'infection et au moment de la crise, constatation qui confirme les observations antérieures de Metchnikoff[2] et de Cantacuzène[3]. D'ailleurs, plus d'une fois on a vu ces spirochètes dans le protoplasma des leucocytes exsudés dans la cavité péritonéale et on a décrit leur involution progressive au sein de ce protoplasma (Metchnikoff, Sawtchenko).

Tout cela n'est pas sans prouver que les globules blancs doivent être considérés à juste raison, comme des éléments qui absorbent les principes immunogènes et qui élaborent des anticorps capables d'agir d'une façon élective sur ces principes.

1. Levaditi, *Congrès intern. d'Hygiène de Bruxelles*, 1903.
2. Metchnikoff, *Virch. Arch.* vol. CIX, p. 176.
3. Cantacuzène, Ces *Annales*, 1899.

Quelques objections ont été formulées contre cette manière de voir. Ainsi, M. A. Wassermann ayant constaté que les leucocytes puisés dans le sang et l'exsudat péritonéal des animaux immunisés contre le bacille typhique et le pneumocoque, à l'encontre des organes leucopoïétiques, ne possèdent nul pouvoir préventif, se refuse d'attribuer à ces leucocytes un rôle quelconque dans la fabrication des anticorps. Nous ne possédons pas d'expériences se rapportant à ce sujet. Néanmoins, si l'on compare les globules blancs de la circulation générale aux leucocytes qui n'ont pas encore quitté les appareils leucopoïétiques, on saisit certaines différences qui peuvent expliquer les résultats obtenus par M. Wassermann. Il y a tout d'abord la question d'âge ; en effet, la série entière de leucocytes granulés jeunes, depuis le myéloblaste de Naegeli, jusqu'au myélocyte, n'abandonne jamais à l'état normal les tissus leucopoïétiques pour se répandre dans le système vasculaire. Ce système ne renferme que des globules blancs granulés ayant achevé leur entière évolution. Or, il n'est pas impossible que ces derniers se comportent d'une façon différente des globules blancs jeunes, au point de vue de l'élaboration ou de l'excrétion des anticorps.

D'un autre côté, les leucocytes de la circulation générale et des exsudats flottent librement dans le plasma et sont par conséquent, dans des conditions qui s'écartent sensiblement de celles où se trouvent les cellules blanches logées dans le système lymphopoïétique. Et, s'il est permis de formuler une hypothèse, on pourrait penser que dans le plasma sanguin, il existe des principes *excitosécréteurs*, de vraies *sécrétines*, qui, en agissant sur les leucocytes circulants, provoquent une excrétion rapide et intégrale des anticorps élaborés et contenus dans ces leucocytes.

Une autre objection a été formulée par M. Pfeiffer, dans son rapport présenté au Congrès d'Hygiène de Bruxelles [1]. Ce savant affirme que la présence des anticorps dans les organes hématopoïétiques n'est pas une preuve en faveur de l'origine leucocytaire de ces anticorps, pour le motif que ces organes ne fabriquent pas exclusivement des globules blancs, mais aussi du *plasma sanguin*.

Il est difficile de se rendre compte de la portée de cette objection, étant donné que l'origine du plasma hématique est des moins

1. R. Pfeiffer, *Rapport fait au Congrès intern. d'Hygiène de Bruxelles*, 1903.

précisée, toutes les cellules pouvant agir indifféremment sur ce plasma, qui est leur milieu liquide. Aucune donnée physiologique ne nous autorise, en effet, à admettre que la moelle osseuse, ou l'épiploon, par exemple, interviennent plus que le foie ou le rein, dans l'élaboration des principes constitutifs de ce plasma.

Les objections formulées par MM. Pfeiffer et Wassermann peuvent donc être facilement écartées, ce qui laisse sa pleine valeur à la conclusion que nous avons énoncée plus haut, à savoir que le *leucocyte est le principal producteur d'anticorps bactériolytiques.*

IV

Nos recherches, telles que nous les avons exposées jusqu'ici, présentent une lacune. Si ces recherches montrent que les leucocytes contenus dans les organes leucopoïétiques produisent les anticorps spirilliques, elles ne nous renseignent pas sur la manière dont les principes immunogènes, les spirilles, réussissent à atteindre ces organes, pour y provoquer l'élaboration de la sensibilisatrice. On avait admis jusqu'à présent que les spirilles introduits dans la cavité péritonéale des animaux réfractaires à la maladie y subissent une destruction intégrale grâce à l'intervention des phagocytes (Sawtchenko). Ils disparaissent au bout de peu de temps de cette cavité, sans que leur disparition soit précédée par l'arrêt de leurs mouvements. Dès lors, pour expliquer, la pénétration des spirochètes ou de leurs débris, dans des organes hématopoïétiques situés loin du péritoine, telle que la moelle osseuse par exemple, il fallait admettre que les leucocytes péritonéaux, chargés de spirilles ou de produits résultant de leur transformation, gagnaient ces organes par l'intermédiaire de la circulation sanguine ou lymphatique.

Nos constatations nous ont montré que l'invasion des spirilles dans le système hématopoïétique s'opère d'une toute autre façon. En effet, nous avons pu voir, soit à l'aide de l'inoculation des animaux sensibles, soit au moyen de l'examen microscopique, que *les spirilles introduits dans le péritoine du lapin, pénètrent activement dans la circulation générale et se répandent dans les organes, tout en conservant leur virulence.*

Expérience XII. — 2 lapins reçoivent dans la cavité péritonéale 15 c. c. de sang de poule, riche en spirilles. Ils sont sacrifiés par saignée à blanc, 24 et 48 heures après l'injection. Les organes servent à préparer des émulsions dans de l'eau salée à 8 0/00, émulsions que l'on injecte, en même temps que le sang défibriné et l'exsudat péritonéal, à des calfats (à la dose de 5 c. c.).

TABLEAU V

ORGANES	LAPIN 24 HEURES	LAPIN 48 HEURES
Foie	+ le 3e jour	0
Rate	+ le 3e jour	0
Ganglions	+ le 8e jour	0
Moelle osseuse	+ le 7e jour	0
Epiploon	+ le 3e jour	0
Exsudat	+ le 7e jour	0
Sang	+ le 3e jour	0

Il résulte de cette expérience, qu'au moins une partie des spirilles introduits dans le péritoine du lapin, apparaissent dans la circulation générale et pénètrent, au moyen de cette circulation, dans des organes situés plus ou moins loin de cette cavité. Il y a donc *une vraie spirillose du lapin*, constatation précieuse, puisqu'elle nous explique le mode suivant lequel l'agent antigène atteint, chez des animaux réputés réfractaires à la maladie, les tissus hématopoïétiques, pour provoquer une formation d'anticorps dans ces tissus. Pourtant, il ne semble pas qu'il s'agisse ici d'une multiplication intense des spirilles dans l'organisme du lapin. En effet, il nous a été impossible, en pratiquant des passages successifs de sang spirillique d'un lapin à l'autre, de réaliser une augmentation de la virulence et de provoquer une maladie mortelle, même chez les jeunes animaux. Généralement, le sang devient stérile au bout de 2 à 3 passages. Reste à savoir si en affaiblissant l'organisme des mammifères par des moyens toxiques ou infectueux, on n'arriverait pas à rendre pathogène pour ces mammifères, le spirille de Marchoux et Salimbeni. C'est là une question que nous nous réservons et qui fera le sujet d'une étude ultérieure.



CONCLUSIONS

1. La formation des anticorps spirilliques a lieu, chez les organismes réfractaires à la septicémie brésilienne, dans les organes leucopoïétiques, en particulier dans la *rate,* la *moelle osseuse* et les *ganglions lymphatiques.*

Elle a lieu également dans l'*épiploon*, qui devient un dépôt de globules blancs chez les animaux inoculés dans la cavité péritonéale. *Les leucocytes doivent être considérés, par conséquent, comme la source principale, sinon exclusive, d'anticorps.*

2. La pénétration des spirilles dans les organes producteurs de principes immunisants, a lieu par l'intermédiaire de la circulation générale. Ces spirilles, introduits dans le péritoine du lapin, ne tardent pas à envahir cette circulation, d'où ils disparaissent au bout de peu de temps. La transmission des spirochètes d'un animal à l'autre, devient impossible au bout de 3 passages.

SUR L'EXISTENCE D'UN FIXATEUR

DANS L'ORGANISME DE L'ANIMAL JOUISSANT DE L'IMMUNITÉ NATURELLE

Par M. PIERRE ZABOLOTNOFF (DE KASAN).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff)

Malgré le nombre considérable de travaux consacrés à l'étude des facteurs qui jouent un rôle actif dans l'organisme animal jouissant de l'immunité naturelle, contre un microbe, la science n'a pas encore dit le dernier mot sur cette question, qui est envisagée de diverses façons.

Actuellement, deux théories principales sont en présence : d'un côté, la théorie cellulaire, développée et soutenue par M. Metchnikoff et ses élèves; d'autre part, la théorie humorale, dont Buchner, Pfeiffer et d'autres sont les défenseurs ardents.

D'après la théorie de M. Metchnikoff[1], chez les animaux jouissant de l'immunité naturelle, le rôle principal appartient à la phagocytose, au moyen de laquelle l'organisme détruit les microbes.

L'étude des propriétés bactéricides du sérum a amené Buchner à conclure que ces propriétés sont surtout intimement liées à la présence d'un certain principe, qu'il a nommé alexine.

D'autre part, en étudiant le phénomène de Pfeiffer, Bordet a démontré que 2 principes y jouent un rôle prépondérant ; l'un est renfermé dans le sérum spécifique rendu inactif par chauffage à 56° et l'autre dans le sérum frais normal. Au pre-

1. METCHNIKOFF, *L'Immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, 1901, p. 217.

mier, il donne le nom de substance sensibilisatrice, le second est précisément l'alexine de Buchner.

Ces 2 principes sont nécessaires pour produire la désagrégation granuleuse des vibrions du choléra, phénomène connu sous le nom de phénomène de Pfeiffer.

Bordet et Gengou [1] ont découvert, au moyen d'un procédé spécial, la présence de substances sensibilisatrices ou fixateurs dans les sérums spécifiques.

Dans un de ses articles sur les phénomènes d'agglutination, Bordet [2] formule l'hypothèse de l'existence de propriétés communes aux sérums spécifiques et aux sérums normaux. Ceux-ci ne contiennent-ils pas en faibles proportions les mêmes principes actifs qui se développent dans les sérums spécifiques fournis par les animaux immunisés contre les microbes ? Ainsi, en combinant l'action de 2 sérums normaux sur les vibrions cholériques, il est possible de constater leur transformation granuleuse.

Il en est de même, si l'on ajoute à la culture de vibrions du sérum frais de cobaye à une certaine quantité de sérum normal de cheval chauffé. Autrement dit, il pourrait exister une substance sensibilisatrice ou fixateur dans le sérum normal de cheval.

Cependant, Bordet ne se prononce pas définitivement.

Pfeiffer [3] avait fait antérieurement la même observation sur le sérum chauffé de chèvre. Wechsberg [4] a démontré la présence du fixateur du bacille typhique dans le sérum normal de lapin.

Malvoz [5] a découvert dans le sérum normal de chien la présence du fixateur du bacille du charbon, en se servant de la méthode de Bordet et Gengou. Le sérum de chien se comportait exactement comme le sérum d'un cobaye ayant reçu de la bactéridie charbonneuse.

1. Bordet et Gengou, Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1901, n° 5.

2. Bordet, Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum. *Annales de l'Instit. Pasteur*, 1899, p. 273,

3. Pfeiffer, Weitere Mittheilungen über die specifischen Antikorper der Cholera, *Zeitschr. f. Hygiene, und Infectionskrankheiten*. Bd. XX.

4. Wechsberg, Zur Lehre von der naturlichen Immunität und über bactericide Heilsera. *Zeitschr. f. Hyg. und Infectionskrankheiten*. Bd. XXXIX, s. 169.

5. Malvoz, Contribution à l'étude des fixateurs du sérum normal de chien. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902..

Les expériences de Bail[1] et Petterson[2] confirment les observations de Malvoz. Il suppose un certain rapport entre la sensibilité de l'animal au charbon et la présence ou l'absence des fixateurs du bacille du charbon dans le sérum.

Il est nécessaire de poursuivre la question dans la même voie afin de juger si le phénomène est général. Les observations faites jusqu'à présent ne résolvent pas le problème, étant donné leur caractère isolé.

Pour éclaircir la question de la préexistence des fixateurs dans l'organisme animal jouissant de l'immunité naturelle contre les microbes, je me suis servi de cobayes, animaux tout à fait réfractaires au bacille du rouget des porcs.

*
* *

Dans mes recherches de l'existence d'un fixateur dans le sérum normal de cobaye, j'ai utilisé la méthode de Bordet et Gengou. Pour avoir à ma disposition une quantité suffisante de microbes du rouget des porcs, j'ajoutais au bouillon ordinaire le tiers de son volume de sérum de porc. Avant de commencer l'expérience, les microbes étaient séparés du milieu de culture par centrifugation et lavés dans l'eau physiologique. Je préparais une émulsion de bacilles dans l'eau physiologique de façon qu'elle ait un aspect laiteux.

Le sérum de porc animal, très sensible au microbe en question, et l'eau physiologique servaient pour le contrôle.

On préparait plusieurs tubes à essai contenant les mélanges suivants :

Le 1er renfermait de l'alexine (sérum frais de cobaye), de l'émulsion de bacilles et du sérum chauffé de cobaye.

Dans le 2e, le sérum de cobaye était remplacé par le sérum de porc.

Dans le 3e, le sérum était remplacé par l'eau physiologique.

1. Bail, Untersuchungen über natürliche und Künstliche Milzbrandimmunität. *Centralblat für Bakteriologie*, Bd. XXXIII, s. 610.

2. Petterson, Ueber die natürlehe Milzbrandimmunität des Hundes und des Huhns. *Centralbl. f. Bakteriologie*, Bd. XXXIII, s. 613.

Le 4e ne contenait que de l'alexine et de l'eau physiologique.

Ainsi, 4 tubes à essais servaient à l'experience : 3 contenaient l'émulsion de bacilles, le 4e n'en contenait pas.

Moins de 1/2 heure après l'addition des globules rouges sensibilisés de lapin, dans le tube qui ne contenait que l'eau physiologique et l'alexine l'hémolyse était complète. Évidemment, la quantité d'alexine était suffisante pour produire une hémolyse complète, car tous les globules étaient décolorés et on n'apercevait au fond du tube que des stromas incolores. Cependant les choses se passaient autrement dans le tube contenant l'émulsion de bacilles. Au bout d'une demi-heure ou de 1 heure après l'addition des globules sensibilisés, l'hémolyse complète n'avait pas lieu ; on remarquait dans tous les tubes une coloration faible, dont l'intensité n'augmentait qu'après quelques heures.

Quoique loin d'être complète, l'hémolyse était plus nettement caracterisée dans le premier et dans le second tube à essai, qui contenaient du sérum chauffé de cobaye et du sérum de porc, ce qui semblait indiquer la présence d'un fixateur dans les sérums employés.

Mais contre cette conclusion s'élève le fait que dans le tube où le sérum est remplacé par l'eau physiologique, l'hémolyse se fait aussi.

La présence des bactéries est donc par elle-même un obstacle à l'hémolyse complète, en dehors d'une influence quelconque du sérum chauffé de cobaye ou de porc. Il y a eu ici absorption d'alexine par les bacilles, sans qu'un fixateur ait joué le rôle d'élément intermédiaire.

En analysant cette expérience, nous voyons que la quantité d'alexine était parfaitement suffisante pour hémolyser complètement les globules rouges ajoutés. Mais cette dose d'alexine ne suffit plus à déterminer l'hémolyse complète en présence de l'émulsion des bacilles.

Pour obtenir l'hémolyse complète en présence des bacilles, sans augmenter la dose d'alexine, on peut diminuer la quantité des bacilles ou bien augmenter la quantité d'alexine sans diminuer la masse des bacilles, ou bien encore, tout en augmentant la dose d'alexine, on peut prendre une émulsion moins épaisse.

Une autre expérience a été faite dans les mêmes conditions que la précédente, avec cette différence que l'émulsion des bacilles était moins épaisse et avait été additionnée de différentes doses d'alexine : 2 c. c. ; 4 c. c. ; 6 c. c, On préparait avec chacun de ces mélanges 3 tubes à essai : avec le sérum de cobaye, le sérum de porc et l'eau physiologique.

Le résultat de la seconde expérience a été quelque peu différent. En premier lieu, la marche de l'hémolyse a été parallèle dans tous les tubes, aussi bien avec le sérum de cobaye ou le sérum de porc, qu'avec l'eau physiologique.

Le tube contenant 2 c. c. d'alexine donnait une coloration nette, mais une partie des globules reste intacte; avec 4 c. c. d'alexine, l'hémolyse était presque complète, car, au fond, on voyait à peine quelques globules encore colorés. Mais, 3 heures après, leur hémoglobine est dissoute; enfin, avec 6 c. c. d'alexine, l'hémolyse complète survenait rapidement.

L'expérience répétée donna chaque fois un résultat identique.

Quelle conclusion peut-on en tirer?

Si le fixateur était réellement contenu dans le sérum du cobaye, l'hémolyse n'aurait pas lieu, ou bien elle serait plus faible que dans les tubes de contrôle. Dans ce cas, l'alexine se serait fixée sur les microbes sensibilisés.

Mais, dans notre expérience, l'hémolyse nette a lieu dans tous les tubes, aussi bien avec le sérum de cobaye ou le sérum de porc, qu'avec l'eau physiologique.

Ainsi, nous devons conclure que le sérum normal de cobaye, qui est un animal naturellement réfractaire au microbe du rouget des porcs, ne contient pas de fixateur vis-à-vis de ce microbe.

* * *

On ne saurait donc généraliser l'idée exprimée par Malvoz, à savoir qu'il existe un rapport entre l'immunité naturelle de l'animal et la présence dans son organisme de fixateurs spécifiques. Dans le cas actuel cette idée ne se confirme pas.

La manière dont l'organisme animal résiste au microbe du

rouget a été étudiée par M. Metchnikoff[1] sur les lapins et par M. Mesnil[2] sur les souris. Le premier a démontré que dans l'organisme du lapin, peu sensible à ce microbe, les bacilles sont détruits uniquement par les phagocytes.

M. Mesnil a également étudié la phagocytose sur les souris : il inoculait les unes avec la culture des bacilles, les autres étaient traitées en même temps avec le sérum préventif de lapin immunisé, il observa la phagocytose chez les unes et les autres, avec cette différence que chez les souris ayant reçu le sérum préventif, la phagocytose était beaucoup plus rapide et que les bacilles étaient englobés dans un temps relativement très court.

J'ai encore refait la même expérience avec les cobayes pour étudier sur eux la phagocytose.

On introduisait dans la cavité abdominale de 1 c. c. à 1,5 c. c. de culture pure. Deux heures après l'injection de la culture, dans l'exsudat recueilli, on trouvait un petit nombre de leucocytes renfermant quelques bacilles. La plus grande partie des bactéries se trouvaient libres dans l'exsudat. 3 heures après, la quantité de bactéries englobées était plus grande. L'exsudat recueilli au bout de 6 à 7 heures ne contient presque plus de microbes en liberté; l'immense majorité est englobée par les leucocytes, surtout par les polynucléaires, dont quelques-uns sont remplis de bacilles. Dans certains leucocytes, à côté des bactéries nettement colorées, on peut rencontrer des bacilles à peine colorées d'un brun rougeâtre. L'exsudat recueilli au bout de 10 heures diffère en ce que dans certains leucocytes les bactéries prennent un aspect granuleux plus ou moins prononcé. L'exsudat recueilli au bout de 22 heures 1/2 est assez riche en cellules. Quoique les polynucléaires constituent la plus grande partie des éléments cellulaires, les bactéries ne s'y trouvent qu'en nombre limité. Elles se trouvent au contraire renfermées dans les mononucléaires. Il est à remarquer aussi que ces derniers ont visiblement augmenté de volume et contiennent dans leur intérieur de 1 à 4 polynucléaires, sans compter les globules rouges. Les bacilles sont rassemblés en une masse unique, ou en 2 ou 3 masses sépa-

1. Metchnikoff, Étude sur immunité, *Annales de l'Instit. Pasteur*, 1889.

2. Mesnil, Sur le mode d'action du sérum préventif contre le rouget des porcs. *Annales de l'Instit. Pasteur*, 1898.

rées. Il est même souvent impossible de distinguer les bacilles individuellement, car ils se présentent comme un amas granuleux.

Cela est encore plus visible quand on fait des préparations avec de l'exsudat recueilli 30 heures après l'inoculation. Ici la masse des bacilles est complètement transformée en grains moins nombreux déjà que dans les préparations précédentes.

Pour déterminer à quel point sont virulents les bacilles ainsi englobés et savoir au bout de combien de temps ils sont digérés à l'intérieur des leucocytes, on inocula l'exsudat à des souris. La souris à laquelle on avait inoculé l'exsudat recueilli au bout de 3 heures succomba en 4 jours. 2 autres souris, qui avaient reçu, l'une, l'exsudat recueilli au bout de 7 heures, et l'autre, l'exsudat recueilli au bout de 10 heures, succombèrent au bout du 5e jour.

Les faits observés nous permettent de conclure que la préservation de l'organisme du cobaye a lieu au moyen de la phagocytose, qui est déjà évidente au bout de 3 heures et très nettement caractérisée au bout de 7 heures. A ce moment, la réaction phagocytaire est complète, car l'exsudat ne contient plus de bactéries en liberté.

Pendant les premières 10 heures, les agents de la destruction des microbes sont les leucocytes polynucléaires, et ensuite apparaissent les mononucléaires, qui achèvent la digestion des bactéries.

Dans quel état les bactéries étaient-elles englobées par les leucocytes : étaient-elles mortes ou vivantes ? Il est évident qu'elles étaient vivantes et virulentes puisque l'exsudat recueilli après 7 à 10 heures, alors que tous les bacilles sont englobés, tue les souris auxquelles il est inoculé.

Nous pouvons conclure que :

1° Le sérum de cobaye ne contient pas de fixateur spécifique vis-à-vis du bacille du rouget des porcs ;

2° La protection de l'organisme de cet animal contre le microorganisme en question se fait uniquement par voie de phagocytose.

Je suis heureux d'exprimer ma profonde reconnaissance à

mon illustre maître M. le professeur Metchnikoff et au docteur Besredka, pour leurs excellents conseils, qui m'ont aidé à achever le présent travail.

Sur l'isolement de la zymase des végétaux

ET DES TISSUS ANIMAUX

REVUE CRITIQUE

Mémoire 1. — Julius Stoklasa et F. Cerny, *Berich. d. d. Chemis. Gesell.*, t. XXXVI, n° 3, 1903.
— 2. — Julius Stoklasa. Communication, V[e] Congrès de Chim. appl. Berlin, juin 1903.
— 2. — Julius Stoklasa et Cerny, *Centralb. f. Physiol.*, t. XVI, n° 23.
— 4. — Julius Stoklasa, J. Jelinek et F. Cerny, *Central. f. Phys.* t. XVI, n° 25.
— 5. — Eug. Simaczek, *Central. f. Phys.*, t. XVII, n° 1.
— 6. — — — — t. XVII, n° 8.
— 7. — Julius Sotklasa und Cerny, *Berichte d. d. Chemis. Gesell.*, t. XXXVI, n° 16.
— 8. — Julius Stoklasa, *Central. f. Phys.*, t. XVII, n° 17.
— 9. — J. S. *Deutsche, Med. Wochen.*, 1904, n° 6.
— 10. — J. Stoklasa. *Archiv. f. de Gesamm. Physiol.*, t. CI, p. 311.

La diastase qui dédouble les hexoses en deux molécules d'alcool et deux molécules d'anhydride carbonique, admise par Berthelot et Claude Bernard, recherchée sans succès par Pasteur, a été isolée de la levure en 1897 par Buchner qui lui a donné le nom de zymase.

J'ai montré la place qu'elle occupe parmi les diastases digestives : elle prend une part prépondérante à l'assimilation des sucres. J'ai établi aussi qu'elle se forme dans les conditions de vie normale, c'est-à-dire au contact de l'air ou à l'abri de l'oxygène suivant que la cellule qui la produit est aérobie ou anaérobie. On ne peut pas l'isoler facilement de toutes les cellules vivantes; mais elle traduit le plus souvent sa présence par son action sur les sucres à l'abri de l'air. En particulier, s'il est difficile de la mettre en évidence chez les végétaux supérieurs, un séjour plus ou moins long à l'abri de l'oxygène la fait apparaître. La fermentation qui se déclare dans ces conditions se présente comme un fait isolé, inexplicable parce qu'il ne semble pas se rattacher aux fonctions normales de la cellule; mais si on considère que la production de zymase se présente comme un phénomène de régénération de la diastase plus ou moins altérée, on a là une preuve de sa présence en vie normale [1].

[1] P. Mazé, *C. R.*, juillet 1902; ces *Annales*, mai 1904.

Il y a encore un moyen plus direct de le montrer, c'est de l'isoler. MM. Stoklasa et ses collaborateurs prétendent y être parvenus. Leurs essais ont porté, sur des végétaux préalablement privés d'air par submersion, en présence d'une atmosphère d'hydrogène, pendant un temps assez long pour permettre à la zymase de se former, sur des végétaux frais, sur des tissus animaux encore tièdes.

Leurs résultats appuyés par un grand nombre de chiffres ont paru dans une série de mémoires publiés dans divers journaux.

Pour isoler la zymase, M. Stoklasa et ses collaborateurs ont employé un procédé qui tient à la fois de la méthode de Buchner (broyage des matériaux et extraction du suc par pression) et de celle d'Albert (traitement du jus par un mélange d'alcool et d'éther).

Les végétaux ou les tissus animaux, finement broyés avec du sable fin et anguleux, sont soumis au moyen d'une presse hydraulique à une pression de 250 à 300 at. Le jus est aussitôt traité par un mélange d'alcool et d'éther dans de longues éprouvettes à pied. Quand le précipité s'est déposé à peu près, on décante le mélange éthéro-alcoolique et on lave rapidement à l'éther seul, toujours par décantation, pour chasser le plus vite possible l'alcool qui altère rapidement la zymase. On essore enfin à la trompe et on sèche dans un courant d'air à 30° ou dans le vide sulfurique.

Le précipité séché de cette façon est réduit en poudre et introduit dans une solution de glucose à 15 0/0, à raison de 10 grammes environ par 100 c. c. de solution.

Comme antiseptique, les auteurs ont employé du sublimé à 0,01 0/0 ; du toluène à 1 0/0 et du thymol à 0,4 0/0. Ces préparations sont mises à fermenter à une température de 28-30°, lorsqu'elles sont faites avec des organes végétaux, et à 38-40° si elles sont obtenues en partant des tissus animaux. Lorsqu'on mélange la poudre diastasifère sèche avec la solution sucrée, on observe une fermentation immédiate et parfois tumultueuse.

Mais toutes ces opérations demandent à être faites très rapidement pour aboutir à un succès certain.

Dans le tableau suivant, j'ai réuni les chiffres les plus élevés que M. Stoklasa et ses collaborateurs ont obtenus avec les zymases qu'ils ont tirées de divers végétaux après les avoir maintenus pendant un temps plus ou moins long à l'abri de l'air.

	CO^2 dégagé grammes.	Alcool produit grammes.
Racines de betteraves	1,25	1,37
Pommes de terre	0,88	0,79
Pois (graines)	0,387	0,427

Les végétaux frais et les tissus animaux encore tièdes traités de la même façon conduisent aux mêmes résultats.

Voici quelques-uns des chiffres obtenus :

	CO^2 dégagé. grammes.	Alcool produit. grammes.
Plantules de pois de 20 jours.	0,384	0,423
Racines de betteraves........	0,45	0,54
Viande de bœuf.............	1,01	1,16
— —.................	1,38	1,45
Poumons de bœuf...........	3,088	3,201

Ces chiffres sont empruntés au mémoire n° 1. Ils semblent parfaitement concluants et montrent que la zymase existe dans les végétaux, dans les tissus animaux, aussi bien à l'état frais qu'après une privation plus ou moins prolongée d'oxygène.

Mais M. Stoklasa et ses collaborateurs sont revenus depuis sur ces résultats, et ils n'ont pas gagné en assurance.

La fermentation n'est pas, en effet, toujours immédiate ; mais elle se déclare cependant dans les 6 à 12 heures qui suivent l'introduction de l'extrait sec et pulvérisé dans les solutions sucrées, à la température de 30° ou de 40° suivant l'origine de la diastase; et c'est toujours à la zymase qu'il faut l'attribuer.

Une autre préoccupation très importante aussi se traduit déjà dans le mémoire n° 2. Malgré l'emploi d'antiseptiques, il y a des ferments dans les solutions sucrées, à la fin de l'expérience ; ils ont été isolés, cultivés à part dans des milieux sucrés et on a constaté qu'ils ne produisent pas de fermentation alcoolique. On n'a d'ailleurs trouvé que trois espèces microbiennes : le *bacillus coli*, le *bacillus subtilis* et un *bacillus fluorescens*.

Les quantités d'acide carbonique qu'ils dégagent sont, du reste, insignifiantes ; elles atteignent en moyenne 0,008 à 0,024 gramme au bout de 36 heures à 38° en présence de thymol ; mélangées ensemble, les trois espèces en dégagent 0,0028 à 0,007 gramme pendant le même temps; il n'y a donc pas de fermentation.

D'ailleurs, si on opère avec beaucoup de précaution, après avoir stérilisé les récipients, les solutions de glucose, etc., les solutions sucrées additionnées de poudre diastasifère peuvent rester pures de microbes pendant toute la durée de l'expérience ; on ne trouve pas non plus de ferments anaérobies.

La méthode d'isolement de la zymase, sur laquelle les auteurs ont été sobres de détails dans le mémoire n° 1, se précise par la suite en se modifiant toutefois.

C'est ainsi que les quantités d'alcool et d'éther qui servent à préci-

piter les sucs obtenus par pression s'emploient dans les porportions suivantes pour les végétaux :

Suc	500 c. c.
Alcool	400 —
Éther	200 —

Le suc obtenu en partant de tissus animaux est traité par le mélange suivant :

Suc	300 c. c.
Alcool	350 —
Éther	300 —

Enfin on s'est arrêté définitivement aux proportions suivantes :

Suc	300 c. c.
Alcool	500 —
Éther	500 —

La dessiccation du précipité se faisait dans un courant d'air chaud à 30° (mémoire n° 1); ce procédé a été abandonné par la suite et remplacé par le vide sulfurique.

Malgré toutes les précautions, les perfectionnements, les résultats les plus récents restent beaucoup moins probants que ceux du mémoire n° 1, si bien que l'on devient un peu sceptique lorsque les auteurs viennent affirmer qu'ils ont démontré également la présence, dans les cellules végétales et animales, de la diastase lactique qui dédouble le sucre en deux molécules d'acide lactique et lorsqu'ils signalent la présence de l'acide acétique et quelquefois de l'acide butyrique parmi les produits de fermentations diastasiques. Il devient évident qu'on se trouve là en présence des produits de fermentations microbiennes, et si ce fait a échappé à M. Stoklasa et à ses collaborateurs, c'est parce qu'ils ont négligé de pousser assez loin leurs investigations ou qu'ils ont employé des milieux de culture impropres à cette démonstration.

Ils signalent encore d'autres faits assez inexplicables; tel l'inactivité du jus entier qui sort de la presse. Ce jus ne renferme pas de zymase; tout au plus a-t-il un pouvoir glycolitique faible; mais l'extrait qu'on en retire par le procéde indiqué renferme de la zymase. C'est certainement la première fois qu'on signale un fait de cet ordre; et il semble assez curieux que l'alcool et l'éther qui atténuent l'activité de toutes les diastases y compris la zymase de la levure et de l'*Eurotiopsis Gayoni*, fassent naître cette zymase des végétaux et des cellules animales dans un milieu qui n'en renferme pas. On retrouvera la raison de cette anomalie plus loin. Il s'agit maintenant de discuter les résultats que j'ai rappelés brièvement.

Si on considère, dans la série des mémoires, les appréciations émi-

ses sur la marche de la fermentation, on constate qu'elle est toujours immédiate et parfois tumultueuse, (mémoire n° 1); cela veut dire qu'elle se déclare dès que le mélange de la poudre diastasifère avec la solution sucrée est opéré. Si cette observation est juste, c'est assurément la meilleure preuve que l'on puisse donner de l'existence de la zymase; mais cette affirmation est rectifiée dans le mémoire n° 2; la fermentation est immédiate ou tout au moins se déclare dans les 12 heures; mais c'est toujours la zymase qui agit. Alors, on ne s'explique pas qu'elle soit restée 12 heures inactive à 38° pour se réveiller ensuite et produire une fermentation qui devient bientôt tumultueuse et forme une épaisseur de plusieurs centimètres de mousse persistante.

Quand elle est immédiate, on ne comprend pas non plus qu'au bout de 24 ou 48 heures on ne trouve que 200 c. c. environ de CO^2 dégagé.

Voici, en effet les, chiffres fournis par deux expériences faites sur des graines de pois, mémoire n° 1.

	Durée de la fermentation. Heures.	CO^2 dégagé. Grammes.	Alcool formé. Grammes.
Expérience I.	24	0,396	0,409
Expérience II.	48	0,387	0,427

Une fermentation immédiate, se déclarant dans 100 c. c. de liquide. met en liberté, au bout d'une heure, plus de 200 c. c. de CO^2. Le liquide doit être en effet sursaturé de gaz avant qu'il puisse se former des bulles de CO^2. Le coefficient de solubilité est alors voisin de 2, et comme il s'en perd par diffusion et par dégagement direct de bulles gazeuses dès que la fermentation devient visible, il faut bien admettre qu'une fermentation aussi rapide se déclarant dans 100 c. c. de liquide dégage bien près de 200 c. c. de CO^2 au bout d'une heure; on ne comprend donc pas qu'il ne s'en forme pas davantage au bout de 24 ou 48 heures.

Les auteurs ont fait usage d'antiseptiques; ils ont employé du sublimé à 0,01 0/0 ; du toluène à 1 0/0 ou du thymol à 0,4 0/0. — Le sublimé introduit à cette dose dans une liqueur qui renferme 10 grammes de matières protéiques est immédiatement éliminé par précipitation; il devient donc à peu près inactif; le toluène est un antiseptique faible et le thymol n'a pas d'action sensible à la température de 38-40°; c'est cependant à ce dernier que M. Stoklasa a eu recours de préférence aux autres.

Les renseignements que l'on possède déjà sur la zymase de la levure, de l'Eurotiopsis, permettent de prévoir que l'isolement de cette diastase est une opération difficile, lorsqu'on s'adresse aux végétaux supérieurs et aux tissus animaux qui sont très pauvres en zymase.

On peut admettre que la levure employée dans ce but telle qu'elle sort de la brasserie peut décomposer en moyenne 10 fois son poids

de sucre en 24 heures à la température ordinaire; 1 kilogramme de levure fraîche a fourni à M. Buchner 500 c. c. de jus qui décompose 80 grammes de sucre en 24 heures. Le rendement en zymase par le procédé de Buchner est donc à peu près 1/120. L'Eurotiopsis dédouble son poids de sucre en 24 heures; lorsqu'on traite le mycélium par le mélange éthéro-alcoolique, (alcool absolu 3 p., éther rectifié 1 p.) il ne conserve que le 1/12 de son activité initiale; le jus obtenu par pression à 500 atmosphères, ne possède non plus que 1/12 environ de l'activité du mycélium normal. Si on admet, ce qui est tout à fait rationnel, que la zymase des végétaux supérieurs se détruit dans les mêmes proportions que celle de la levure ou de l'Eurotiopsis lorsqu'elle est soumise au même traitement, on peut prévoir que la quantité de zymase que l'on peut extraire des plantes ou des graines doit être extrêmement faible. J'ai constaté en effet que les graines de pois dédoublent à peu près le 1/100 de leur poids de sucre en 24 heures à la température de 22-25°. Il faut donc employer 100 grammes de graines pour obtenir 0gr,5 d'alcool en 24 heures; comme la perte de zymase pendant l'isolement est d'environ 11/12, c'est 1200 grammes de graines qu'il faut épuiser pour obtenir 0gr,5 d'alcool en 24 heures; et comme le jus entraîne 15 0/0 de substances sèches de la graine, les 1,200 grammes de graines fournissent 180 grammes de précipité environ ; 10 grammes de précipité produisent donc 25 c. c. de CO^2 a peu près en 24 heures. Si on remarque en outre que le procédé d'isolement employé par M. Stoklasa double les causes de destruction de la zymase, on ne peut pas s'attendre à observer, dans les conditions où les auteurs se sont placés, une fermentation immédiate et parfois tumultueuse.

Voilà ce que l'examen des faits connus permet de prévoir; mais il se peut que la zymase des végétaux supérieurs ou des animaux soit plus résistante que celle de la levure ou de l'Eurotiopsis; l'expérience ne justifiera pas cette supposition.

A côté de ces critiques d'ordre général, on peut encore relever dans les recherches de M. Stoklasa et de ses collaborateurs, quelques points de détail qui méritent d'être signalés, par exemple ; lorsqu'ils opèrent dans des conditions d'*asepsie absolue* ils ne trouvent pas de microbes dans les solutions qui ont fermenté. On peut stériliser les récipients et les solutions sucrées qui doivent recevoir la poudre diastasifère; mais le suc cellulaire et le précipité qu'on en retire ne peuvent être traités, transvasés, séchés, pesés et introduits en dernier lieu dans les solutions, sans qu'on puisse éviter les germes qui sont en suspension dans l'atmosphère du laboratoire; les conditions d'*asepsie absolue* sont donc loin d'être réalisées.

Il est enfin utile de faire remarquer que le *bacillus coli* forme, aux

dépens du sucre, de l'alcool, de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO^2 et de l'hydrogène, contrairement à l'opinion formulée par M. Stoklasa.

Il résulte de tous ces faits que les auteurs se sont trouvés en présence de fermentations microbiennes et qu'ils ont négligé d'en rechercher les preuves. Il ne suffit pas, en effet, d'isoler quelques espèces et de constater qu'elles ne font pas fermenter les sucres ; il faut s'assurer qu'à côté d'elles il n'y en a pas d'autres qui sont plus actives quoique plus difficiles à isoler. Le nombre des espèces qu'on n'a pas encore réussi à cultiver est assez grand pour ne jamais les perdre de vue.

Il est donc nécessaire de rechercher si aucun produit de fermentation ne peut être attribué exclusivement à une action microbienne.

Il est en outre indispensable de déterminer rigoureusement le moment précis où le dégagement de gaz commence; lorsque le début de la fermentation ne peut être constaté qu'après 12 heures de séjour à la température de 38° on ne saurait l'attribuer à l'action de la zymase libre, car la marche du phénomène ne reproduit nullement les caractères d'une action diastasique; celle-ci atteint son maximum dès que la température des solutions s'est mise en équilibre avec celle du milieu ambiant, et à partir de ce moment elle décroît graduellement jusqu'à zéro.

Pour fixer l'instant exact où le dégagement commence, il y a un moyen bien simple, c'est de faire le vide dans les récipients où l'on a introduit les solutions diastasiques et de les munir d'un tube manométrique à mercure. Les premières traces de gaz mises en liberté font baisser la colonne mercurielle.

Comme le tube manométrique n'est autre chose qu'un tube de dégagement, le même dispositif permet de recueillir sous le mercure les premières bulles de gaz qui se dégagent pour en faire l'analyse ; car il ne faut pas oublier que les espèces microbiennes qui peuplent les milieux sucrés dégagent pour la plupart du CO^2 et de l'hydrogène.

Voilà donc les deux points importants qui permettent à mon avis de s'assurer si on se trouve en présence de fermentations microbiennes ; c'est pour cela que je leur ai prêté la plus grande attention dans mes essais.

Les résultats que j'ai publiés dans ces *Annales*, p. 378-384, ont été obtenus pour la plupart au mois de juin 1903. A cette époque, les auteurs n'avaient encore publié qu'un mémoire ; comme les procédés d'isolement ont varié depuis, j'ai repris tout récemment ces essais avec des poumons de bœuf encore tièdes.

Le jus extrait par la presse a été divisé en deux portions, la portion

A est celle qui passe entre 0 et 250 atmosphères ; la portion B s'écoule entre 250 et 400 atmosphères.

Ces deux portions ont été traitées séparément et simultanément; les précipités secs qu'elles ont fournis ont été répartis par fractions de 10 grammes dans des ballons de 150-200 c. c. qui recevaient ensuite 100 c. c. de solution de glucose à 15 0/0.

Les essais ont donc porté :

I. — 1° Sur les jus entiers A et B tels qu'ils sortent de la presse ; 2° sur les précipités qu'ils ont fournis, additionnés ou non d'antiseptiques dans les proportions suivantes :

II. — Toluène à 1 0/0 A et B.

III. — Thymol à 0,4 0/0 A et B.

IV. — Témoins sans antiseptique A et B.

Les jus entiers étaient additionnés de 15 0/0 de glucose mais les ballons qui les contenaient n'avaient pas été stérilisés, et on n'avait pris aucune précaution contre l'intervention des microbes. Les solutions sucrées, séries II, III et IV, avaient été au contraire préalablement stérilisées, ainsi que les ballons qui les avaient reçues.

Les résultats fournis par ces expériences à la température de 38° correspondent assez bien à ceux que M. Stoklasa et ses collaborateurs ont obtenus : les voici brièvement résumés :

1. — Le dégagement de gaz ne se manifeste dans aucun ballon avant 10 heures de séjour à 38°.

2. — Il commence dans les séries III et IV à peu près en même temps; dans toutes les autres il est en retard de plusieurs heures sur ces deux séries. Très lent au début, il augmente peu à peu pour atteindre son maximum au bout de 5 à 6 heures, c'est-à-dire après un séjour de 16 heures à 38°. On a recueilli dans ces conditions jusqu'à 100 c. c. de gaz par heure ; mais le dégagement se ralentit après 24 heures assez rapidement.

3. — Le thymol ne gêne pas la fermentation ; le précipité A est aussi actif que le précipité B, dans les séries III et IV ; le toluène retarde et gêne la fermentation ; son action est plus sensible sur le précipité B que sur le précipité A ; le niveau du mercure baisse de 10 centimètres bout de 48 heures dans le ballon qui a reçu le premier et de 50 dans le second. Les jus entiers de la série I ne donnent non plus qu'un dégagement insignifiant; le jus B est encore moins actif que le jus A.

4. — Le mélange gazeux qu'on recueille sous le mercure renferme du CO^2 et de l'hydrogène, en proportions à peu près égales ; le gaz carbonique devrait être en excès si la liqueur n'en retenait à l'état dissous.

5. — Les produits qu'on retrouve à la fin de l'expérience sont l'alcool, l'acide lactique, l'acide acétique.

6. Si on examine au microscope le contenu des ballons, on constate partout la présence des microbes; on en a isolé un certain nombre d'espèces qui donnent lieu à des fermentations très actives dans les milieux sucrés et forment tous les produits signalés plus haut.

Parmi ces résultats, il faut remarquer surtout ceux qui ont été fournis par les jus entiers; ces jus semblent offrir une résistance assez grande aux invasions microbiennes; et c'est à cette particularité qu'il faut attribuer l'inactivité que lui ont reconnue les auteurs.

S'il ne renferme pas de zymase, on ne comprend plus que le précipité qu'on en retire par l'addition d'alcool et d'éther, introduit dans une solution sucrée, donne naissance à une fermentation alcoolique. Le fait s'expliquerait jusqu'à un certain point si le suc cellulaire était pauvre en extrait, car l'addition de 10 grammes de précipité à la solution sucrée fournirait un milieu beaucoup plus riche en zymase que le jus entier si toutefois les réactifs n'en détruisaient pas ; mais il n'en va pas ainsi ; le suc cellulaire fourni par les tissus animaux ou par les graines, est riche en extrait; ainsi :

100 c. c.	du jus A	fournissent	11,86	grammes	de précipité.
100 c. c.	— B	—	8,7	—	—

De sorte qu'en introduisant 100 grammes de poudre sèche dans 100 c. c. de solution sucrée, on réalise à peu près la concentration initiale ; et le mélange ainsi obtenu ne diffère du jus normal qu'en ce que le précipité, réduit en poudre fine, ne se dissout pas bien et ne reste pas en suspension dans la liqueur; il faut remarquer en outre que l'action de l'alcool-éther ne peut qu'altérer ou détruire les diastases du jus normal et probablement ausssi les traces de zymase qu'il peut renfermer.

J'ai enfin isolé, en collaboration avec M. Perrier, des solutions soumises à l'expérience, un certain nombre d'espèces microbiennes qui sont des ferments alcooliques actifs, surtout lorsqu'on les cultive à l'abri de l'air. Ils sont en même temps des agents de combustion, car ils décomposent l'eau en mettant de l'hydrogène en liberté. La quantité de CO^2 qu'ils dégagent est supérieure au chiffre théorique qui correspond à l'alcool trouvé dans le liquide de culture.

Les résultats de M. Stoklasa sont en grande partie d'accord avec cette constatation (mémoire 2); les auteurs en font d'ailleurs la remarque. La concordance aurait été encore plus grande, s'ils s'étaient servi d'appareils moins compliqués qui diminuent les causes d'erreurs.

A côté de l'alcool, ces ferments produisent encore, aux dépens du sucre, de l'acide lactique et de l'acide acétique.

Les propriétés de ces ferments les rapprochent par conséquent des ferments lactiques, et il est intéressant de faire cette constatation si

l'on remarque que les milieux constitués par le mélange du précipité obtenu par l'action de l'alcool-éther sur les sucs végétaux ou animaux, avec des solutions sucrées ne sont pas sans analogie avec le lait qui se laisse également envahir très rapidement par les ferments lactiques.

On voit donc que les résultats observés par M. Stoklasa et ses collaborateurs se vérifient avec la plus grande facilité; mais tels qu'ils les ont donnés ils sont incomplets, et surtout mal interprétés; les fermentations qui se déclarent dans les milieux qu'ils réalisent sont dues, d'après mes résultats, à des microbes et non à la zymase isolée des cellules végétales ou animales.

Mais je ferai remarquer ici une fois de plus qu'il ne résulte pas des aits qui précèdent, que les cellules animales et végétales ne renferment pas de zymase.

Elles produisent de l'alcool lorsqu'on les prive d'air; et l'on ne peut attribuer sa production qu'à la zymase.

Le Gérant : G. Masson

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE SEPTEMBRE 1904 N° 9

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Sur l'accoutumance à la tuberculine

Par M. H. VALLÉE (d'Alfort).

« Les injections successives de tuberculine répétées chaque jour, chez des sujets tuberculeux de l'espèce bovine, ou à quelques jours d'intervalle, donnent, écrivait Nocard en 1892, des réactions graduellement moins intenses. Il se produit une véritable accoutumance à l'action de la tuberculine; mes observations semblent établir que cette accoutumance est très passagère[1] .»

Plus tard, notre regretté maître entreprend sur un lot très important d'animaux tuberculeux, une série d'expériences sur l'accoutumance à la tuberculine[2]. Il constate alors qu'en renouvelant l'injection 24 heures après en avoir fait une première, on n'obtient de réaction que sur le 1/3 environ des animaux qui avaient réagi à la première intervention.

Le résultat obtenu n'est pas meilleur si les injections successives sont espacées de quarante-huit heures : le tiers à peine des animaux tuberculeux réagit à la deuxième injection.

En attendant 8 jours pour renouveler l'opération, Nocard n'obtient de réaction que sur la 1/2 de l'effectif; après 15 jours.

1. Ed. Nocard, Article tuberculose. — *Dictionnaire vétérinaire pratique*, t. XXI, p. 449.

2. Ed. Nocard, *Bulletin de la Société centrale de Médecine vétérinaire.* 28 janvier 1897.

la proportion des animaux tuberculeux qui réagissent de nouveau est des 2/3 environ.

« Bref, écrit Nocard, pour obtenir une deuxième réaction sur tous les malades, il faut de 25 à 30 jours — en chiffres ronds *un mois plein*, — d'intervalle entre les deux injections. Après ce délai d'un mois, l'absence de réaction est tout à fait exceptionnelle. »

Cette véritable accoutumance à la tuberculine est un fait bien établi aujourd'hui; beaucoup d'agriculteurs peu scrupuleux le mettent d'ailleurs à profit dans les ventes d'animaux, pour tromper l'acheteur qui songerait à tuberculiniser le sujet récemment acheté avant de l'introduire dans ses étables! De même à nos frontières où, seuls, les animaux qui ne réagissent point à une épreuve à la tuberculine sont admis à l'importation, l'accoutumance à la tuberculine est largement utilisée par les importateurs; certains d'entre eux font systématiquement aux animaux qu'ils doivent présenter à la frontière une injection de tuberculine la veille ou l'avant-veille de l'épreuve légale. La fraude se pratique tout aussi largement aux diverses frontières de l'Allemagne. C'est ainsi que, sur 41,808 bovidés introduits dans ce pays en 1901, puis presque tous sacrifiés, dans des abattoirs publics, 7,194, soit 17,7 0/0 ont été reconnus tuberculeux; à la frontière cependant, ils n'avaient point réagi à la tuberculine!

Il est fort heureux que la merveilleuse puissance révélatrice de la tuberculine soit solidement établie de tous côtés et au-dessus de toute contestation, car ces incidents savamment exploités par de mauvais esprits ou par des personnes malveillantes pourraient nuire considérablement à l'action sanitaire chaque jour plus pressante en matière de tuberculose.

Dans un très remarquable article sur la *Lutte contre la tuberculose bovine en Norwège*[1], le Dr Malm écrit : « Il pourra se produire des erreurs (lors des tuberculinisations) quand il s'agit d'animaux qui ont été l'objet d'une véritable immunisation. Mais l'expérience démontre que cette dernière est tout à fait irrégulière, passagère et incertaine, et qu'elle est relativement facile à faire disparaître. Ces erreurs seraient d'ailleurs faciles à prévenir à l'aide de quelques règlements administratifs : interdiction de délivrer la tuberculine à d'autres qu'aux vétérinaires,

1. *Revue générale de médecine vétérinaire*, t. II, 1903, p. 401.

surveillance rigoureuse de son emploi, utilisation dans les étables d'importation d'une tuberculine très toxique et à haute dose; séjour prolongé des animaux dans les établissements de quarantaine, observation consciencieuse et examen sévère des animaux pendant les épreuves. »

Je ne veux point douter de l'efficacité des mesures préconisées par mon savant collègue; malheureusement, certaines de celles-ci sont, à coup sûr, d'une application quasi impossible, en France tout au moins. Il est fort difficile pratiquement de maintenir longtemps en quarantaine les animaux présentés à l'importation, de même qu'il est impossible de ne point voir la tuberculine en d'autres mains que celles légalement chargées d'utiliser le précieux réactif.

MM. Nocard et Roux avaient pensé tourner toute difficulté à la frontière, en conseillant l'emploi d'une tuberculine spéciale, fort énergique, qui permettait d'obtenir des réactions typiques chez les animaux tuberculeux ayant reçu trente-six ou quarante-huit heures auparavant une forte injection de tuberculine ordinaire.

Il n'est pas douteux qu'un tel produit aurait pu être utilisé très heureusement par les agents sanitaires à la frontière.

Mais les savants auteurs de cette proposition ne songeaient point à utiliser leur nouveau réactif dans les cas, fort nombreux, où des propriétaires français se débarrassent, au profit de leurs concitoyens, de leurs animaux tuberculeux après les avoir tuberculinisés. C'eût été, en effet, laisser le nouveau produit, comme l'ancien, à la disposition de tous, de telle sorte que l'acheteur de bonne foi qui, sans méfiance, aurait soumis ses animaux à l'épreuve de la nouvelle tuberculine eût été exposé à ne point les voir réagir et aurait, de ce chef, subi une perte qui ne devait point lui incomber.

Ainsi la question restait entière; un procédé permettant de déjouer la fraude avec certitude, de vaincre l'accoutumance à la tuberculine, était encore à trouver.

Je me suis donc préoccupé de cette importante question.

Il convenait tout d'abord de rechercher de quelle façon se comportent, au point de vue thermique, les sujets tuberculeux lorsqu'on les soumet à des injections successives d'une même tuberculine : Nocard, dans ses expériences sur l'accoutumance,

est placé uniquement dans les conditions de l'opération telle qu'on la pratique couramment ; lors d'une seconde, d'une troisième injection de tuberculine à un animal, il relevait — comme au moment de la première intervention — les températures toutes les 2 ou 3 heures, et seulement à partir de la 9e ou 10e heure.

N° des animaux.	1re TUBERCULINISATION		2e TUBERCULINISATION	
	RÉACTION	HEURE à laquelle la température suffisante pour conclure s'est manifestée.	RÉACTION	HEURE à laquelle la température suffisante pour conclure s'est manifestée.
1........	2°9	10e heure.	2°3	6e heure.
2........	2,3	11e —	2,6	6e —
3........	2,7	10e —	1,7	6e —
4........	2,1	11e —	2,5	6e —
5........	1,7	11e —	2,6	2e —
6........	2,7	9e —	2,1	6e —
7........	2,6	10e —	1,9	10e —
8........	2,6	11e —	1,8	7e —
9........	3,1	9e —	1,8	6e —
10........	2,7	10e —	3,1	7e —
11........	2,2	10e —	3,4	9e —
12........	1,8	9e —	2,6	7e —
13........	1,7	15e —	3,1	7e —
14........	3°	11e —	2,3	5e —
15........	2,1	9e —	2,1	6e —
16........	2,3	9e —	2°	5e —
17........	1,9	11e —	0,9	8e —
18........	2°	9e —	2,3	6e —
19........	2°	9e —	1,3	8e —
20........	2,7	9e —	1,8	5e —
21........	1,3	10e —	1°	9e —
22........	1,8	9e —	1,3	8e —
23........	1,3	9e —	1°	8e —
24........	2,1	8e —	2,7	4e —
25........	1,2	16e —	1,3	8e —
26........	2,7	9e —	3,7	4e —
27........	1,3	9e —	1,6	8e —
28........	2,1	9e —	1,9	7e —
29........	2,7	11e —	3,7	3e —
30........	2,2	10e —	2,1	9e —
31........	1,7	9e —	1,4	10e —
32........	2,4	8e —	1°	10e —
33........	2,1	11e —	1,1	8e —
34........	2,1	10e —	1,9	9e —
35........	1,9	10e —	1,9	10e —
36........	2,4	10e —	2,2	9e —

Il était permis de se demander si une première inoculation de tuberculine ne *sensibilise* point l'animal tuberculeux, et si celui-ci ne réagit pas plus tôt et d'une façon moins durable aux seconde et troisième inoculations qu'à la première.

J'ai pratiqué chez des bovidés qui venaient de subir une vive réaction à la tuberculine une nouvelle injection du même produit, et j'ai toujours constaté que si l'on prend les températures de 2 heures en 2 heures après l'inoculation, on observe une élévation rapide et très marquée de la température, élévation assez caractéristique dans tous les cas pour qu'elle permette de déclarer au moins suspect l'animal éprouvé, tandis que des sujets non tuberculeux restent indifférents à cette même intervention.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-contre :

En somme, sur 36 bovidés reconnus tuberculeux ou suspects à l'épreuve initiale de la tuberculine, il n'en est pas un seul qui ait semblé indemne à une seconde épreuve pratiquée 48 ou 36 heures seulement après la première, avec une dose double de la même tuberculine, les températures étant soigneusement relevées de 2 en 2 heures aussitôt après la seconde tuberculinisation.

A la première épreuve pratiquée dans les conditions ordinaires, sur 36 animaux, 32 pouvaient être déclarés certainement tuberculeux, 4 devaient être considérés comme suspects.

A la seconde épreuve effectuée dans les conditions indiquées ci-dessus, 28 encore pouvaient être considérés comme malades, 8 comme suspects. *Aucun ne passait pour indemne!*

Si cette même épreuve avait été pratiquée selon la technique courante, en ne relevant les températures qu'à partir de la 12e heure, on n'aurait, d'après les observations de Nocard, relevé de réaction que sur le 1/3 environ des animaux, *plus de 20 d'entre eux auraient donc été déclarés indemnes!*

Si l'on considère les courbes relevées lors de la 2e injection, on est frappé de la rapidité avec laquelle se manifeste la réaction. Ainsi des indications nettes étaient obtenues :

A la 10e heure chez	4 sujets.
9e — —	5 —
8e — —	7 —
7e — —	5 —
6e — —	8 —
5e — —	3 —
4e — —	2 —
3e — —	1 sujet.
2e — —	1 —

A la 8e heure après l'injection, il ne restait donc que 9 résultats à venir ; à la 11e heure, des indications précises étaient fournies pour tous les animaux.

Si les températures avaient été relevées à partir de la 10e ou de la 12e heure seulement, les résultats eussent été tout différents ; de l'examen de la courbe secondaire thermique de la réaction, il résulte très nettement que *cette réaction est brutale, fugace*, tandis que *la réaction initiale est toujours d'assez longue durée.*

Ainsi, l'un de nos sujets d'expérience fournit les réactions suivantes :

1re injection.		2e injection	
10e heure	2°,5	8e heure	2°,6
13e —	2,5	12e —	0,8
17e —	3,1		

Lors de la deuxième intervention, la température ne fournissait donc plus d'indications exactes dès la 12e heure : la réaction avait été intense cependant, mais fugace.

Voici un autre exemple du même fait, lors d'une réaction secondaire :

6e heure	R = 2°7
12e —	R = 0,3

Je me crois donc autorisé à conclure de tout ce qui précède que *l'accoutumance du bœuf à la tuberculine n'existe pas dans la très grande majorité des cas.*

Les bovidés tuberculeux réagissent presque toujours à une seconde injection de tuberculine pratiquée peu de temps après la première, mais *cette réaction secondaire est précoce et de très courte durée* [1].

L'accoutumance est si peu marquée, — si elle existe, — que j'ai pu obtenir chez des animaux atteints de tuberculose pulmo-

1. Peut-être les animaux très tuberculeux, phtisiques, — qui semblent mal réagir à la tuberculine — se comportent-ils comme les sujets préalablement tuberculinisés et réagissent-ils plus rapidement ?

On s'expliquerait alors pourquoi ces malades ne paraissent point réagir dans les conditions ordinaires de l'opération.

naire ou mammaire, toute une série de réactions dans l'espace de quelques jours. En voici quatre :

	21 nov. 1903.	25 novembre.	27 novembre
Tuberculose mammaire..	R = 2°9	R = 2°3	R = 2°6
	15 décembre.	16 décembre.	18 décembre.
Tuberculose pulmonaire..	R = 3°	R = 2°3	R = 2°
	30 nov. 1903.	2 déc. 1903.	7 décembre
Tuberculose pulmonaire..	R = 3°1	R = 1°8	R = 2°6
	30 novembre.	2 décembre.	7 décembre.
Tuberculose pulmonaire..	R = 2°1	R = 2°7	R = 3°8

Il semble donc difficile de réaliser une véritable immunisation contre la réaction à la tuberculine. Même en utilisant préalablement des doses massives de tuberculine très toxique (50 grammes de tuberculine brute), on n'arrive pas à supprimer, dans tous les cas, pour les jours qui suivent, les réactions consécutives aux injections de la dose classique de tuberculine utilisée pour le diagnostic expérimental.

Il est donc possible de tirer des constatations rapportées ci-dessus des indications utiles pour déjouer les fraudes si fréquentes dans le commerce et à l'importation des animaux de l'espèce bovine.

Si le vétérinaire soupçonne que l'animal suspect qui lui est présenté a subi une tuberculinisation préalable, il devra pratiquer l'épreuve révélatrice de la façon suivante :

Injecter à l'animal suspect vers 5 heures ou 6 heures du matin une dose de tuberculine double de celle qu'on utilise ordinairement (8 *c. c. de tuberculine diluée au dixième pour les grands animaux* 4 *c. c. pour ceux de petite taille* [1]).

Prendre les températures toutes les deux heures à partir du moment de l'injection jusque vers la 14e *ou la* 15e *heure.*

La réaction est mesurée par l'écart entre la température du moment de l'injection et la plus haute température relevée durant les heures qui suivent. Tout animal qui fournira une réaction de 1°,5

1. A cette dose, la tuberculine est admirablement supportée par les animaux les plus tuberculeux; elle ne donne aucune réaction chez les sujets indemnes.

devra être considéré comme tuberculeux; une réaction comprise entre 0°,8 *et* 1°,5 *entraînera la suspicion.*

Il est absolument indiqué de ne point soumettre à l'épreuve tout animal dont la température atteint 39°. *On évitera en outre de faire boire les animaux dans l'heure qui précède chaque prise de température.*

Je suis convaincu qu'en s'entourant de ces précautions, on retirera toujours d'utiles indications des inoculations répétées de tuberculine.

Des injections fréquentes de fortes doses de tuberculine permettraient sans doute d'obtenir une véritable immunisation des bovidés tuberculeux contre l'action hyperthermisante de ce précieux réactif.

Cette opération ne peut être menée à bien par les personnes qui exploitent actuellement la soi-disant accoutumance à la tuberculine; elle serait d'ailleurs fatale à nombre d'animaux malades.

RECHERCHES SUR LA COMBUSTION RESPIRATOIRE

Production d'acide citrique par les citromyces

PAR P. MAZÉ ET A. PERRIER

Toutes les cellules vivantes sont le siège d'une combustion lente produite par l'oxygène libre ou combiné. On connaît peu de choses sur le mécanisme de cette combustion malgré les efforts dépensés dans ce sens depuis les travaux de Lavoisier.

On s'est surtout attaché à l'étude de ses manifestations extérieures qui se traduisent par une absorption d'oxygène et un dégagement de CO^2. Si on considère les volumes de gaz échangés avec le milieu ambiant, on constate que le rapport $\frac{CO^2}{O^2}$, est généralement voisin de l'unité, lorsqu'il s'agit de cellules aérobies. Les chimistes s'en sont autorisés pour conclure que la combustion est directe, c'est-à-dire que l'oxygène se fixe directement sur le carbone pour le transformer en acide carbonique.

Mais les physiologistes, après avoir montré qu'un muscle au repos prend plus d'oxygène qu'il n'élimine de gaz carbonique, qu'il produit au contraire plus de CO^2 qu'il n'absorbe d'oxygène pendant le travail, qu'il dégage enfin de l'anhydride carbonique, pendant un temps assez long, dans une atmosphère de gaz inerte, n'admettaient pas sans réserves l'opinion des chimistes. D'après eux, l'oxygène est certainement un agent de combustion; mais les oxydations sont indirectes. « Le phénomène consiste en des dédoublements chimiques très certainement de la nature des fermentations, mais actuellement plutôt soupçonnés que bien connus. » Tout inconnu que soit le rôle de l'oxygène, « il est bien certain que ce gaz est fixé dans l'organisme et qu'il devient un des éléments de la constitution ou de la création organique [1]. »

Après avoir fait quelques détours, et tenté quelques interprétations dans un sens ou dans l'autre, l'opinion revient aux idées de Claude Bernard.

1. CLAUDE BERNARD, *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*, p. 170 et 171. Baillière et fils, Paris, 1878.

Ainsi, si on considère la combustion du sucre, on constate qu'il se dédouble le plus souvent en alcool et CO^2, avant de servir à l'alimentation de la cellule vivante. Le gaz carbonique se forme donc de cette façon sans intervention de l'oxygène libre. Il est le produit d'un acte de digestion et non d'une combustion respiratoire.

L'alcool doit être oxydé à son tour, et à son sujet, on peut rééditer la double hypothèse déjà énoncée : l'oxydation est-elle directe ou indirecte? Les faits manquent pour répondre. Entre l'alcool d'une part, le gaz carbonique et l'eau d'autre part, on ne trouve pas d'intermédiaire. Tout au plus, peut-on montrer, en se plaçant dans des conditions particulières, que les cellules aérobies produisent de petites quantités d'aldéhyde [1]. Mais ce corps n'est jamais libre parce qu'il disparaît dès qu'il se forme :

L'un de nous a interprété les phénomènes de nutrition de la manière suivante [2] : « On peut concevoir que l'édifice moléculaire d'une substance protoplasmique puisse ne jamais se créer de toutes pièces, la semence qui l'a hérité de ses ancêtres le transmettra à ses descendants. Quand la germination commence, c'est le travail d'entretien qui apparaît; de sorte que la vie semble se manifester d'abord par un processus de désassimilation qui donne naissance à de l'acide carbonique, de l'eau, des hydrates de carbone insolubles, des matières grasses, des résidus azotés, etc... ; cette usure réduit l'édifice moléculaire initial, l'entame en quelque sorte de tous les côtés, et c'est pour réparer ces pertes que l'être vivant fait des emprunts incessants aux aliments dont il dispose, mais il ne les prend pas sous les formes où ils se présentent; il les prépare par un travail de digestion, les disloque, provoque des ruptures qui font naître des fonctions chimiques nouvelles douées de grandes affinités qui leur permettent de se combiner à l'édifice initial, de contrebalancer ses pertes, d'augmenter son poids. C'est dans ce dernier cas qu'il y a multiplication cellulaire et accroissement de substances vivantes. »

Claude Bernard avait déjà exprimé la même opinion [3] : « Nous devons faire ici une remarque importante. Nous n'assis-

1. P. Mazé, Ces *Annales*, t. XIV, page 350; t. XVI, p. 346.
2. Mazé, Ces *Annales*, t. XVI. Mai 1902, pages 376 et 377.
3. *Loc. cit.*, page 208.

tons pas à la synthèse directe du protoplasma primitif non plus qu'à aucune autre synthèse primitive dans l'organisme vivant. Nous constatons seulement le développement, l'accroissement de la matière vivante: mais il a toujours fallu qu'une sorte de levain vital ait été le point de départ. Au début du développement d'un être vivant quelconque, il y a un protoplasma préexistant qui vient des parents et siège dans l'œuf. Ce protoplasma s'accroît, se multiplie et engendre tous les protoplasmas de l'organisme. En un mot, de même que la vie de l'être nouveau, n'est que la suite de la vie des êtres qui l'ont précédé, de même son protoplasma n'est que l'extension du protoplasma de ses ancêtres. C'est toujours le même protoplasma, c'est toujours le même être. Le protoplasma a la propriété de s'accroître par synthèse chimique; il se renouvelle à la suite d'une destruction organique. Ces deux propriétés constituent la vie du protoplasma... »

Si on veut résumer brièvement l'état actuel de la question, on peut dire que la combustion respiratoire consiste, soit en dédoublements diastasiques qui donnent naissance au gaz carbonique sans intervention d'oxygène libre, soit en oxydations plus ou moins directes qui aboutissent en dernier lieu à la production de CO^2 et d'eau.

Si l'on n'envisage que les quantités de chaleur dégagée, le résultat est le même, quel que soit le mécanisme de la combustion; une molécule de sucre brûlée directement par l'oxygène comme le charbon dans le foyer d'une machine, ou dédoublée préalablement en alcool et CO^2, l'alcool étant oxydé ensuite progressivement dans la substance vivante à laquelle il s'est combiné, dégage toujours la même quantité d'énergie.

Mais si on se propose de reproduire ces phénomènes de combustion en dehors de la cellule vivante, on peut prévoir qu'il est possible de réussir si la combustion est directe; si, au contraire, elle se fait dans la molécule même de substance vivante, il devient difficile de la réaliser avec un suc cellulaire, parce qu'elle doit exiger une organisation protoplasmique qu'on ne saurait respecter.

Quelle que soit d'ailleurs la justesse de cette vue, les faits plaident pour la difficulté de telles recherches. On a isolé des oxydases; on en a imaginé des synthèses plus ou moins vraisemblables; on a supposé l'existence de peroxydases et envisagé la

possibilité de l'intervention de l'eau oxygénée, de l'oxygène naissant, d'un oxygène actif, mais on n'a pas encore réussi à produire *in vitro* la combustion complète d'une molécule de sucre.

Les oxydases sont pourtant aussi répandues que toutes les autres diastases, et leur rôle est des plus importants, si l'on veut bien considérer qu'elles fournissent à la cellule vivante la presque totalité de l'énergie qu'elle utilise. Leur existence se manifeste d'ailleurs dans tous les sucs cellulaires exposés au contact de l'air; mais celles qu'on a isolées dans ces conditions n'agissent que sur les dérivés benzéniques qui ne sont pas des aliments. M. Gessard a établi qu'elles ont cependant un rôle physiologique en montrant la part de plus en plus grande qu'elles prennent à la formation des pigments[1].

On connaît pourtant une oxydase des substances ternaires alimentaires; c'est la diastase acétique du mycoderma aceti qui transforme l'alcool en acide acétique, par fixation directe d'oxygène. Elle a été mise en évidence par MM. Buchner et Meisenheimer dans le ferment acétique tué par l'acétone[2].

L'acide acétique se présente, dans ces conditions, comme un produit intermédiaire de la combustion de l'alcool, car il est repris par le mycoderme quand l'alcool vient à manquer, et brûlé ensuite sans formation de produits intermédiaires apparents.

Il y a donc des phénomènes d'oxydation directe dans la cellule vivante, que l'on peut reproduire *in vitro* à côté des phénomènes de combustion que l'on n'a pas réussi, jusqu'à présent, à obtenir avec des sucs cellulaires.

Nous nous sommes proposé de préciser les notions que l'on possède sur ces derniers, en étudiant le mode de formation de l'acide citrique.

Nous avons dit que les combustions respiratoires vont, le plus souvent, jusqu'à la formation d'anhydride carbonique et d'eau; mais il y a des exceptions nombreuses à cette règle, surtout dans le monde végétal. Les acides oxalique, tartrique, malique, succinique, citrique peuvent être considérés comme des produits intermédiaires, entre le sucre et les produits de sa

1. *C. R.*, 9 mars 1903, 4 mai 1904.

2. E. Buchner, Meisenheimer, *Berichte d. et chim. Gesells.*, t. XXXVI, p. 634, 638.

combustion totale, et, comme M. Duclaux le faisait très justement remarquer, il y a des respirations carbonique, oxalique, tartrique, etc. Si l'on peut saisir le mode de la formation de chacun de ces termes, on aura élucidé un certain côté du mécanisme des oxydations physiologiques. De tous ces composés c'est l'acide citrique qui se prête le mieux à la démonstration que nous allons aborder.

Si l'on admet que ce corps provient du sucre par oxydation directe, l'équation suivante traduit le phénomène :

$$C^6H^{12}O^6 + 3O = C^6H^8O^7 + 2H^2O. \quad (1).$$

Ce mode de formation, s'il correspond à la réalité, permet de rapprocher l'acide citrique de l'acide acétique au point de vue de son rôle physiologique. Comme ce dernier, il peut être repris par la cellule qui l'a produit si le sucre fait défaut. Il se présenterait donc aussi comme un produit de digestion du sucre qui se formerait, dans certaines conditions, plus vite qu'il n'est utilisé.

Mais à côté de cette interprétation, il y en a une autre qui cadre mieux avec les notions que l'un de nous a établies au sujet de la nutrition hydrocarbonée de la cellule vivante. Partant de cette idée que le sucre est préalablement dédoublé en alcool et CO^2 avant d'être assimilé, on est conduit à orienter les investigations vers une autre voie dont les points de repère sont marqués par les transformations suivantes :

$$C^6H^{12}O^6 = 2C^2H^6O + 2CO^2 \quad (a).$$
$$3C^2H^6O + 9O = C^6H^8O^7 + 5H^2O \quad (b).$$
$$3C^6H^{12}O^6 + 18O = 2C^6H^8O^7 + 10H^2O + 6CO^2 \quad (2).$$

Le sucre est d'abord dédoublé en alcool et CO^2 (*a*), l'alcool étant assimilé et ensuite oxydé et transformé plus ou moins directement en acide citrique (*b*); si on double les deux membres de l'équation (*b*) et qu'on leur ajoute ensuite 6 CO^2, on obtient l'équation (2) qui peut être comparée plus facilement à l'équation (1).

Ces transformations montrent que la production d'acide citrique ne peut être envisagée comme un phénomène d'oxydation directe, car la combustion de l'alcool ne peut donner que de l'aldéhyde, de l'acide acétique et de l'acide oxalique. Elles supposent implicitement que la combustion se fait dans la substance vivante même, et que l'acide citrique s'en détache,

dans certaines conditions, comme un produit de désassimilation.

On voit donc que, si on oppose l'une à l'autre les équations (1) et (2), on pourra conclure que la combustion respiratoire est directe ou indirecte, suivant que l'une ou l'autre de ces deux équations sera vérifiée par l'expérience.

II

GÉNÉRALITÉS SUR LES *Citromyces*.

Avant d'aborder par l'expérience l'examen de la question que nous venons de poser, nous donnerons quelques renseignements sur les champignons que nous avons utilisés dans nos recherches.

L'acide citrique, on le sait, est très répandu dans la nature, il existe surtout dans les végétaux; on en rencontre aussi chez les animaux, en particulier dans le lait de vache.

Wehmer[1] a découvert des champignons qui produisent de l'acide citrique aux dépens du sucre; ces champignons se rangent au point de vue morphologique parmi les Penicillium. Wehmer leur a donné le nom de *Citromyces;* il a décrit 2 espèces : le *C. Pfefferianus* et le *C. Glaber;* mais il a été sobre de détails sur leurs propriétés physiologiques, parce qu'il les a utilisés dans la fabrication industrielle de l'acide citrique.

Ces champignons se prêtent très bien à l'étude du mode de formation de l'acide citrique, parce qu'ils permettent de se rendre maître de toutes les conditions de milieu, de température ou d'aération qui favorisent ou entravent le phénomène en question. Aussi, c'est à eux que nous avons eu recours.

Ils sont très répandus dans les laboratoires; ils appartiennent à cette catégorie de moisissures qui envahissent spontanément les solutions d'acides organiques. Nous en avons isolé 4 espèces différentes; elles se distinguent soit par le caractère de leurs cultures, soit par leurs propriétés physiologiques.

On les rencontre généralement à l'état de pureté dans les solutions concentrées — acide tartrique et citrique à 25 0/0, acide oxalique à saturation, acide lactique à 4,5 0/0. — Nous n'avons utilisé ni l'acide succinique ni l'acide malique pour rechercher d'autres espèces; quant à l'acide acétique, aucune

1. Wehmer, *Bull. de la Société ch. de Paris*, 1893.

moisissure n'y pousse spontanément, si faible qu'en soit la concentration.

Pour faciliter la nomenclature, nous appellerons ces diverses espèces par un nom qui rappelle leur origine. Nous aurons ainsi les *Citromyces citricus*, C. *tartricus*, C. *oxalicus*, C. *lacticus*.

On peut les réunir en deux groupes. L'un renferme le C. *citricus* et le C. *tartricus*; tous deux donnent des voiles très épais qui flottent assez difficilement dans les récipients à grande surface ; les filaments aériens sont longs; la couleur ordinaire de la culture sporulée est d'un gris ardoisé clair ; mais elle vire au vert foncé dès que l'acide citrique apparaît dans la culture; cette couleur se présente dès le début, lorsqu'on la cultive en milieu minéral avec de l'acide citrique comme unique aliment carboné. Sur bouillon de viande sucrée, le mycélium du C. *citricus* reste toujours blanc, même en présence d'acide citrique.

Les C. *lacticus* et *oxalicus* se ressemblent beaucoup, mais diffèrent des précédents par l'aspect de leur voile. Celui-ci reste toujours mince et se développe surtout en surface, de sorte qu'il se plisse beaucoup; les filaments aériens sont très courts et les spores se présentent comme une poussière cendrée d'un bleu ardoisé à la surface du voile membraneux. Le C. *lacticus* produit beaucoup plus d'acide citrique que le C. *oxalicus*.

Dans nos démonstrations, nous avons utilisé surtout le C. *citricus* et le C. *lacticus*.

III

MARCHE A SUIVRE DANS LA DÉMONSTRATION ET PROCÉDÉS DE DOSAGE EMPLOYÉS

L'orientation à donner aux recherches se déduit aisément des considérations développées à priori sur le mécanisme possible de la formation d'acide citrique. Il est en effet tout indiqué d'établir la relation qui existe entre l'apparition de l'acide citrique et le développement des cultures. Si ce composé se forme par voie de désassimilation, on constatera sa présence au moment où le milieu de culture, renfermant encore un excès de sucre, sera privé d'un élément indispensable à la nutrition du

champignon. Mais il faut remarquer qu'une telle hypothèse n'exclut pas la possibilité d'une combustion directe : il suffit de faire observer que l'oxydation directe s'arrête au terme acide citrique en raison des conditions difficiles dans lesquelles se trouve la moisissure.

Il faut donc chercher d'autres preuves. Les sucres ne sont pas les seuls aliments hydrocarbonés de ces champignons; ils se développent, nous l'avons dit, aux dépens des acides organiques, il est donc naturel de rechercher s'ils produisent de l'acide citrique aux dépens de l'acide lactique, de l'acide tartrique, par exemple; ils assimilent aussi la glycérine et l'alcool; nous soumettrons ces composés à la même épreuve. On conçoit en effet que, si l'oxydation du sucre est directe, la production d'acide citrique doit être le résultat d'une action diastasique; mais, comme ces actions sont limitées à des composés de constitution définie, elles ne sauraient s'étendre à des composés aussi différents du sucre que la glycérine ou l'alcool; mais on n'a pas le droit de s'étonner de le voir prendre naissance aux dépens de ces différents aliments, s'il se présente comme le produit d'une action protéolytique s'exerçant sur les substances azotées qui en renferment les éléments constitutifs.

Pour reconnaître la présence de l'acide citrique, nous avons eu recours à la réaction de Denigés[1] basée sur la formation d'un précipité blanc par l'action du sulfate mercurique sur l'acétone dicarbonique, produit d'oxydation de l'acide citrique par le permanganate de potassium; mais ce procédé doit être employé avec prudence, surtout lorsque l'acide citrique est peu abondant. En effet, certains liquides organiques, tel le bouillon de haricots, donnent en présence du sulfate mercurique un trouble blanchâtre qu'il ne faudrait pas confondre avec le précipité en question. Pour obtenir la réaction dans toute sa netteté, il suffit de précipiter l'acide citrique à l'état de citrate de calcium et de le transformer ensuite en sel de soude par ébullition avec du carbonate de sodium.

Mais lorsque l'acide citrique est abondant, il se révèle de lui-même par la formation d'une couche de citrate de chaux, si la culture est faite en présence de carbonate de calcium.

Pour le doser, nous avons utilisé la propriété du citrate de

1. Denigés, *Soc. des Sc. phys. et nat. de Bordeaux*, 1897-1898

calcium d'être insoluble, lorsqu'il est maintenu pendant un certain temps à l'ébullition.

IV

CULTURE SUR MILIEUX SUCRÉS

Les milieux que nous avons employés sont le liquide Raulin, le bouillon de viande et le bouillon de haricots ; c'est ce dernier qui donne les meilleurs résultats. La culture de citromyces que nous avons utilisée dans ces expériences se développe lentement, l'acide citrique apparaît quand le voile a atteint à peu près son développement maximum ; sa formation est indiquée par le changement de couleur de la moisissure et il se produit aussi bien en l'absence qu'en présence du carbonate de calcium. Dans ce dernier cas, sa production est accompagnée d'un dégagement d'acide carbonique provenant de l'attaque du carbonate.

Les chiffres du tableau I donnent quelques indications sur les conditions d'apparition de l'acide citrique, dans les cultures sur bouillon de haricots additionné de glucose, à une température moyenne de 16-22°.

Tableau I.

	I	II	III
Durée de la culture....	14 jours	30 jours	45 jours.
Apparition de l'acide...	12e jour	19e jour	19e jour
Acide citrique formé...	0.671	4.373	4.002
Poids du mycélium....	0.894	1.977	0.988
Volume du liquide de culture..............	100cc	200cc	200cc

Ces résultats sont complétés par ceux du tableau II, fournis par des cultures en bouillon de haricots dans des fioles coniques de 500 c. c. renfermant 100 c. c. de bouillon, 11 gr. 627 de sucre et 22 milligrammes d'azote.

Tableau II.

Durée de la culture.	Poids du mycélium.	Sucre disparu.	Ac. citrique formé.	Azote disparu.	Rendement ac. cit. sucre disparu.
—	—	—	—	—	—
14 jours	0.722	2.138	traces	17.1	»
18 —	0.799	3.029	0.923	17.5	30.4 0 0
21 —	0.797	3.492	1.142	16.3	33.0
27 —	0 851	4.487	1.700	16.3	35.6
34 —	0.890	5.536	2.283	17.5	41.2
41 —	1.033	8.628	3.859	17.4	40.1
57 —	1.132	9.877	4.474	17.4	45.2

Ces chiffres montrent que l'acide citrique se forme au moment où la culture a déjà atteint son développement maximum; il va en augmentant tant qu'il reste du sucre, c'est-à-dire pendant près de deux mois; mais la quantité d'azote assimilé demeure à peu près constante. Comme le poids de la culture augmente, il faut admettre que les cellules jeunes empruntent au mycélium formé antérieurement l'azote dont elles ont besoin.

Nous retrouvons là l'image de ce qui se passe dans les solutions d'acides organiques qu'elles envahissent spontanément. Cette allure laisse supposer que l'acide citrique, survenant seulement au moment où tout l'azote est assimilé, doit être regardé comme le résultat d'un processus de désassimilation.

L'apparition de l'acide citrique est retardé ou avancé suivant que le milieu est pauvre ou riche en azote. Ce fait résulte des cultures effectuées sur liquide Raulin renfermant des doses d'azote variables, 1/4, 1/2, 1 et 2, la dose normale étant représentée par 1. La culture qui a reçu 1/4 de la dose normale d'azote a fourni un voile très léger, son développement a été très lent, si bien que l'acide citrique y est apparu plus tard que dans la culture qui a reçu la dose 1/2. L'apparition de l'acide citrique s'est faite dans l'ordre suivant : 1/2, 1/4, 1. La culture 2 ayant reçu une quantité d'azote double a donné un développement énorme de mycélium, mais l'acide citrique ne s'est montré que longtemps après. La germination des spores a d'ailleurs été pénible en raison de la production d'une trop grande quantité de carbonate d'ammoniaque par l'action de l'azotate d'ammonium sur le carbonate de calcium.

Avec le bouillon de viande, très riche aussi en azote, on obtient également une abondante production de mycélium, mais l'acide citrique n'apparaît encore que très tardivement.

Tous ces faits viennent, comme on le voit, à l'appui des déductions précédentes.

V

ASSIMILATION DE LA GLYCÉRINE

Le bouillon de haricots additionné de doses relativement considérables de glycérine est un excellent milieu de culture pour les espèces de citromyces que nous avons isolées. Toutes

produisent de l'acide citrique aux dépens de la glycérine. Voici les chiffres que nous avons obtenus avec le C. citricus.

TABLEAU III.

Durée de la culture en jours.	Poids du mycélium.	Acide citrique formé.	Azote disparu.
14	0.671	0.091	13.8
18	0.862	0.385	15.9
21	0.882	0.634	15.1
27	0.900	1.204	15.1
34	1.003	2.846	15.7
41	0.964	3.804	17.4
57	1.132	3.81	18.8

Les conclusions que nous avons déduites de l'examen des chiffres du tableau II s'appliquent à la lettre aux résultats du tableau III.

On est donc autorisé à insister ici sur la variation dans l'action d'une oxydase qui transformerait directement le sucre et la glycérine en acide citrique. L'oxydation directe du glucose provoquerait les échanges et les transformations suivants :

$$CH^2OH - (CHOH)^4 - CHO + 3O = CO^2H - CH^2 - \underset{\substack{|\\ CO^2H}}{COH} - CH^2 - COOH + 2H^2O$$

qui sont bien différents de ceux qui s'opèrent avec la glycérine, comme on peut s'en convaincre par l'équation suivante :

$$2\,CH^2OH - CHOH - CH^2OH + 5O = CO^2H - CH^2 - \underset{\substack{|\\ CO^2H}}{COH} - CH^2 - CO^2H + 4H^2O$$

L'acide citrique serait d'après cette dernière transformation un produit de synthèse; ce résultat ne doit pas cependant nous surprendre; il suffit, en effet, que la cellule vivante puisse produire une diastase particulière pour réaliser cette transformation, car, somme toute, la glycérine peut se transformer facilement en sucre et cette transformation est parmi celles que les cellules vivantes réalisent facilement.

La glycérine n'est pourtant pas acceptée dans toutes les conditions par le C. citricus. Le liquide Raulin dépourvu d'acide tartrique et de sucre et additionné de glycérine et de carbonate de calcium est impropre à la culture de ce champignon. Les spores ne germent pas, mais elles se réveillent immédiatement dès qu'on introduit une trace de sucre, après plusieurs semaines de séjour en présence de glycérine. Dans ces conditions, le développement devient très rapide, et la production d'acide citrique

est très abondante. Le C. lacticus est plus rustique, il se développe sans addition de sucre dans le liquide Raulin glycériné, mais son développement est très pénible au début.

VI

ASSIMILATION DE L'ALCOOL

L'alcool est un aliment pour le C. citricus et le C. tartricus; les spores germent rapidement sur liquide Raulin privé d'acide tartrique et de sucre, et additionné de 1 0/0 d'alcool en présence de carbonate de chaux. Mais le voile reste léger, son développement s'arrête; le mycélium examiné au microscope est chargé de cristaux d'oxalate de calcium. Le liquide distillé permet de caractériser la présence de quantités sensibles d'aldéhyde.

Les citromyces lacticus et oxalicus, au contraire, se développent assez facilement; le premier seul produit de l'acide citrique, mais difficilement.

Pour tourner les difficultés, le C. citricus et C. lacticus ont été cultivés sur 100 c. c. de liquide Raulin sans acide, dans quatre flacons coniques contenant chacun 1 gramme de glucose.

Une fois le voile bien formé, on introduit de l'alcool dans deux de ces flacons, les deux autres sont conservés comme témoins. On ajoute ensuite à toutes les cultures un lait de carbonate de calcium. Dans ces conditions, on constate un surcroît de développement dans les cultures qui ont reçu de l'alcool, mais on n'observe à aucun moment la production d'acide citrique dans le milieu. En substituant le bouillon de haricots au liquide Raulin, il est facile de constater au microscope la présence de nombreux cristaux de citrate et d'oxalate de chaux.

L'analyse donne les résultats suivants :

Tableau IV.

		C. citricus.		C. lacticus.	
		Témoin	Alcool.	Témoin.	Alcool.
		—	—	—	—
Poids du mycélium.	En gr.	0.549	1.098	0.526	0.906
Acide citrique......	—	»	0.126	»	0.275
Acide oxalique.....	—	»	traces	»	traces

Ces essais ont été répétés dans de grands matras à fond plat, sans addition de carbonate de calcium, permettant ainsi la production d'une culture plus abondante. Dans deux de ces

matras, ayant reçu au début 2 grammes de glucose, on introduit, une fois le voile formé, 10 c. c. d'alcool. La culture devient très florissante, le milieu donne très nettement la réaction de l'acide citrique et, lorsque les cultures sont arrêtées, on obtient les chiffres suivants :

Tableau V.

		Cultures additionnées d'alcool.		Culture témoin.
Mycélium	En gr.	2.781	3.463	1.956
Sucre restant	—	»	»	»
Alcool restant	—	1.8	6	»
Acide citrique formé	—	0.279	0.267	»
Acide oxalique	—	traces	traces	»

Le citromyces lacticus ensemmencé sur bouillon de haricots non additionné de glucose, mais renfermant 2 0/0 d'alcool, a fourni, pour $4^{gr},839$ de mycélium, $0^{gr},782$ d'acide citrique toujours accompagné de traces d'acide oxalique.

L'alcool, comme la glycérine et le sucre, peut donc servir à la production d'acide citrique, mais la quantité de cet acide formé avec cet aliment est toujours très faible. Il faut chercher la raison de cette différence dans la propriété que possèdent ces moisissures de brûler très facilement les acides et de les brûler préférablement à l'alcool, lorsque ces composés sont mis en concurrence.

C'est ce qui résulte de l'expérience résumée dans le tableau VI, faite avec le citromyces lacticus sur bouillon de haricots additionné d'acide citrique et d'un excès d'alcool.

Tableau VI.

		I	II	III
Durée de l'expérience en jours		8	10	17
Mycélium	En gr.	0.867	0.968	1.515
Acide citrique restant	—	2.595	2.205	traces
Alcool restant	—	0.849	7.68	4.500
Acide citrique initial	—	3.536	3.536	3.536

L'acide citrique disparaît le premier et l'on comprend ainsi qu'il ne se forme pas en abondance lorsque ces moisissures n'ont que de l'alcool comme aliment hydrocarboné. Il n'en est pas moins vrai que l'acide citrique peut se former dans ces conditions.

Les citromyces se développent aux dépens des acides lactique, tartrique, malique, succinique oxalique; mais nous

n'avons pas constaté la production d'acide citrique aux dépens de ces composés, parce qu'ils sont des aliments inférieurs à cet acide.

Puisque les citromyces produisent de l'acide citrique aux dépens de l'alcool, il faut admettre l'existence de la transformation suivante :

$$3C^2H^6O + 9O = C^6H^8O^7 + 5H^2O.$$

Nous ne pouvons pas admettre que cette transformation soit due à une oxydation directe, accomplie avec le concours d'une diastase oxydante; si nous l'avons provisoirement admis pour la glycérine, c'est parce que ce corps se transforme facilement en sucre. La transformation de l'alcool en sucre est le résultat d'une réaction trop complexe pour être réalisée par voie d'oxydation directe; les seuls corps qui dérivent de l'alcool par fixation directe d'oxygène sont, nous le répétons, l'acide acétique, l'acide oxalique, et nous avons vu précisément ce dernier se former abondamment dans la culture du C. citricus nourri avec de l'alcool comme source unique de carbone [1].

Dès lors, si le mode de formation de l'acide citrique par oxydation directe ne semble pas pouvoir être généralisé, il est probable que ce corps prend naissance suivant un autre processus. Pour justifier l'hypothèse que nous avons admise, il faut donc montrer d'abord que l'assimilation du sucre par les citromyces exige son dédoublement préalablement en alcool et acide carbonique.

VII

PRODUCTION DE L'ALCOOL EN VIE ANAÉROBIE

Le procédé employé pour cette démonstration est connu depuis longtemps; il suffit de mettre les végétaux en vie anaérobie pour que l'alcool formé par l'action de la zymase, ne pouvant être utilisé dans ces conditions, s'accumule dans le milieu et dénonce ainsi par sa présence l'existence de la diastase alcoolique.

Dans ce but, les quatre citromyces ont été cultivés dans des

1. Nous ne voulons pas dire par là que ces composés se forment aux dépens de l'alcool par un phénomène de combustion susceptible d'être reproduit *in vitro*; nous admettrons au contraire comme conclusion de nos recherches que l'acide oxalique se forme par oxydation de la substance vivante.

ballons à fond rond contenant 500 c. c. de bouillon de haricots additionné de 5 0/0 de glucose. Lorsque la culture est bien développée, on fait le vide au moyen de la pompe à mercure ou simplement à la trompe, et l'on abandonne ainsi les moisissures à l'étuve à 30° pendant une dizaine de jours. La quantité d'alcool qui se forme dans ces conditions est toujours faible. Le liquide de culture neutralisé est distillé dans un appareil Schlœsing et l'alcool recueilli dans 20 c. c. est caractérisé par la formation d'iodoforme, d'aldéhyde; etc., puis dosé au moyen du compte-gouttes de M. Duclaux, ou par la méthode de M. Nicloux. Le tableau VII résume ces essais.

TABLEAU VII.

		C. citricus. I	C. citricus. II	C. tartricus.	C. lacticus.	C. oxalicus.
Mycélium........	En gr.	3.205	3.025	1.550	2.705	2.004
Alcool...........	—	0.100	0.104	0.130	0.332	0.212
Acide citrique....	—	3.205	4.679	0.847	2.925	2.773
Acidité volatile en $C^2H^4O^2$.		0.345	0.334	0.130	0.725	0.608

Comme nous opérons en présence d'acide citrique, l'alcool pourrait être attribué à la décomposition de cet acide; on sait, en effet, qu'il peut se dédoubler en alcool, acide acétique et acide carbonique.

Mais les citromyces privés d'air ne produisent pas cette transformation. Voici, en effet, les résultats obtenus dans une expérience identique à celle relatée au tableau VII et dans laquelle le sucre était remplacé par de l'acide citrique.

TABLEAU VIII.

	C. citricus.	C. lacticus.
Mycélium............................	1.003	0.956
Alcool................................	»	»
Acidité volatile en $C^2H^4O^2$............	0.056	traces

L'alcool se présente donc comme un produit de dédoublement du sucre et l'acide acétique qui l'accompagne en très faible quantité doit être considéré comme un produit d'autolyse, plus abondant dans un milieu neutre que dans un milieu acide. Comme on sait maintenant que la formation de la zymase en vie anaérobie doit être considérée comme une preuve de son existence en vie aérobie, l'assimilation du sucre par les citromyces se fait suivant le processus ordinaire.

VII

L'ACIDE CITRIQUE EST UN PRODUIT DE DÉSASSIMILATION

Nous sommes ainsi conduits à établir la dernière partie de notre hypothèse, celle qui a trait à la mise en liberté de l'acide citrique.

Lorsque la culture est privée d'azote, alors que le sucre est encore abondant, la prolifération cellulaire reste possible si les éléments jeunes peuvent emprunter leur azote aux cellules âgées. Ce phénomène est très fréquent dans le monde végétal : on sait depuis longtemps qu'une plante affamée d'azote ou d'aliments minéraux continue de végéter très longtemps sans périr; la tige s'allonge lentement; quand de nouvelles feuilles se forment, les ancieunes meurent et se vident en grande partie de leurs éléments minéraux au profit des plus jeunes. Les citromyces qui se développent spontanément dans les solutions d'acides organiques dans l'eau distillée ne se comportent pas autrement. Les plantes et les champignons ainsi affamés se trouvent d'un côté en présence d'une pénurie extrême de certains éléments et de l'autre d'une grande quantité d'aliments carbonés ; ils sont très économes vis-à-vis des premiers et très prodigues des seconds. Dans le cas de nos cultures, c'est l'azote qui est l'aliment rare, c'est lui qui passe d'une cellule à l'autre, décrivant ainsi un cycle ininterrompu tant qu'il reste du sucre en excès et pendant aussi qu'il n'entre pas entièrement dans des combinaisons que la cellule ne peut plus défaire.

Dans cette migration continue, l'azote est libéré plus ou moins complètement de ses groupements carbonés, par voie de protéolyse, et l'acide citrique apparaît au nombre de ces produits ternaires de désassimilation. Il est donc plus ou moins complètement formé dans la substance vivante et, comme il dérive du carbone assimilé, il faut admettre que les phénomènes d'oxydation se produisent dans la molécule de substance vivante même et que l'oxygène emprunté à l'air doit être considéré, suivant l'expression de Claude Bernard, comme un élément de construction organique et non pas comme un élément comburant qui brûlerait les aliments dans les cellules comme il brûle le charbon dans le foyer d'une machine.

Pour montrer que ces considérations sont l'expression

exacte de la réalité, il suffit de prendre des cultures de citromyces au moment où elles sont bien dévoloppées et où elles n'ont pas encore produit d'acide citrique, et de les priver d'air. Dans ces conditions, le mycélium s'autolyse et, comme ses diastases continuent à agir en l'absence d'oxygène, on doit constater la présence d'acide citrique dans le milieu. Le *C. citricus* se prête beaucoup mieux que les autres à cette démonstration parce qu'il fournit un développement mycélien très abondant avant de produire de l'acide citrique. Nous avons donc préparé des cultures de cette moisissure dans des fioles à fond plat capables de résister au vide et renfermant 350 c, c. de bouillon de haricots à 5 0/0 de glucose ; ce milieu est ensuite alcalinisé légèrement avec du carbonate de soude, puis coloré par du tournesol d'orcine. Lorsque le mycélium est bien développé, on fait le vide au moyen de la pompe à mercure et on abandonne la culture à l'étuve à 30° pendant quelques jours. Voici les résultats obtenus dans une de ces expériences :

Tableau IX.

	Mycélium.	Acide citrique formé.	Acidité volatile $C^2H^4O^2$.	Alcool.
	—	—	—	—
(1)	0.986	0.242	0.131	0.060
(2)	1.039	0.185	0.088	0.050

La culture I contenait déjà un peu d'acide citrique au moment où elle a été mise en anaérobiose.

Cette expérience, on le conçoit aisément, ne réussit pas toujours ; l'acide citrique susceptible d'être libéré, par ce moyen, du mycélium n'est pas abondant. Si l'on peut en obtenir de grandes quantités en présence de l'air, il ne faut pas oublier que ce n'est qu'avec le concours du temps. On peut voir en examinant le tableau 1 que 1 gramme de mycélium en produit de 0gr, 15 à 0gr, 2 en 24 heures, la quantité présente à un moment donné est donc très limitée et ce n'est que sur celle-là seule qu'il faut compter, puisque l'alimentation du mycélium est impossible à l'abri de l'air.

Il faut donc conclure de ces expériences que l'acide citrique prend naissance par voie de protéolyse et qu'il constitue un produit de désassimilation accidentel, subordonné à des conditions de vie difficile pour le champignon et à une alimentation carbonée convenable.

VIII

On peut fournir d'autres arguments à l'appui de cette conclusion. Ils sont nombreux, mais moins probants que ceux qui viennent d'être exposés.

En premier lieu, nous ferons remarquer que les rendements en acide citrique, comparés aux chiffres théoriques qui résultent des formules (1) et (2), sont d'accord avec les indications de cette dernière. Mais, pour évaluer ce rendement, il faut faire abstraction de la quantité de sucre employée à la construction du mycélium. Il suffit pour cela de se reporter aux résultats consignés dans le tableau II. Chaque culture comparée à la précédente, à partir de la culture (3), possède à peu près le même poids de mycélium; si nous retranchons respectivement les poids de sucre consommé et les poids d'acide citrique formé, nous aurons à peu près les quantités d'acides correspondant au sucre disparu dans le même temps,

Le tableau suivant résume ce calcul.

Tableau X.

Poids du mycélium.	Sucre disparu.	Différence entre 2 cultures successives.	Acide citrique formé.	Différences.	Rendement 0/0.
0.799	3.029	»	0.923	»	»
0.797	3.492	0.463	1.142	0.219	47
0.851	4.487	0.997	1.700	0.558	56
0.890	5.536	1.049	2.283	0.583	55.5
1.033	8.628	3.092	3.859	0.576	50.9
1.132	9.877	1.249	4.474	0.615	49.2

La dernière colonne donne le rendement ainsi calculé.

Si l'on cherche le rendement théorique d'après la formule (1), on prévoit un rendement d'environ 106 0/0; d'après (2), 71 0/0 seulement. Si l'oxydation se faisait suivant le processus indiqué par la formule (1), comme le mycélium n'augmente pas beaucoup en poids, le rendement pourrait atteindre un chiffre supérieur à 71 0/0; comme il se maintient au-dessous de cette limite, il est d'accord avec les prévisions déduites de l'équation (2).

Cela n'est cependant pas suffisant pour conclure au rejet de l'équation (1), car le sucre détruit peut se répartir en deux portions ; l'une qui est brûlée pour l'entretien du champignon, et l'autre qui sert à la production de l'acide citrique.

La même observation enlève également toute valeur pro-

bante aux arguments tirés de l'étude des échanges gazeux entre le champignon et le milieu ambiant. Nous avons tenu néanmoins à voir comment sont influencés ces échanges par la formation de l'acide citrique. A cet effet, nous avons cultivé la moisissure en atmosphère confinée, fournissant à la plante de l'oxygène au fur et à mesure de sa consommation et absorbant d'un autre côté l'acide carbonique produit.

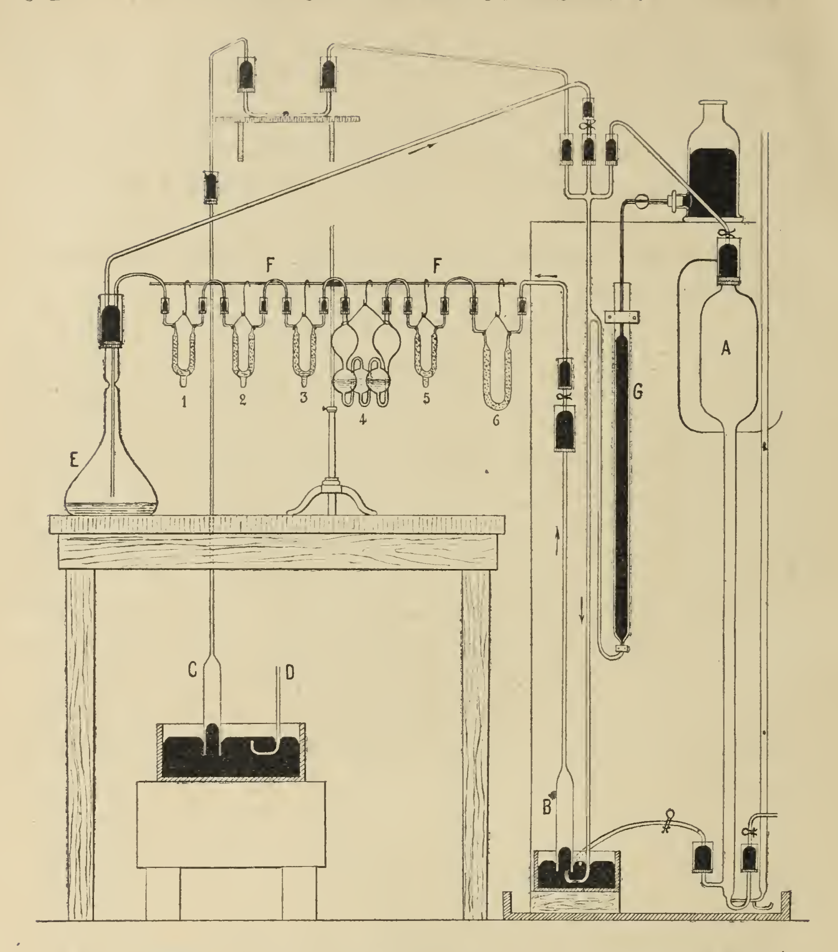
L'appareil employé pour cette étude est représenté par la figure 1 ; il se compose d'un ballon à fond plat de 1 litre environ de capacité, communiquant d'un côté avec une série de tubes absorbants, de l'autre avec la trompe à mercure du volumètre au moyen d'une branche à trois voies. Le même dispositif permet également la communication de la trompe avec le volumètre ou avec la pompe à mercure. Tous les joints sont noyés sous le mercure et l'appareil tout entier est soumis au vide pendant 24 heures avant l'expérience. La manœuvre est évidente. Le volumètre sert pendant toute la durée de la culture, de réservoir d'oxygène. Celui-ci, préparé avec du chlorate de potasse pur, est introduit au moyen de la cloche C, et analysé à l'eudiomètre.

La communication avec la pompe et le ballon étant interrompue, on introduit l'oxygène dans la culture au moyen de la trompe et du tube manométrique B. Le niveau du mercure dans ce tube permet de juger la quantité de gaz introduite, quantité qui peut d'ailleurs être mesurée exactement par le volumètre. L'acide carbonique produit est absorbé par la potasse, lorsqu'on fait circuler le gaz dans l'appareil, au moyen de la trompe, les communications avec la pompe et le volumètre étant supprimées.

L'expérience terminée, le vide barométrique étant fait dans le volumètre, on fait passer dans celui-ci l'atmosphère confinée, d'abord au moyen de la trompe, en prenant la précaution de porter à l'ébullition le liquide de culture, puis, pour les dernières traces de gaz toujours difficiles à extraire, au moyen de la pompe à mercure. Le gaz ainsi obtenu est mesuré et analysé.

Il est donc très facile de savoir la quantité d'oxygène absorbé par la culture et la quantité d'acide carbonique produit.

La valeur du quotient respiratoire calculé sur la totalité de l'oxygène absorbé et du gaz carbonique éliminé par la plante est voisin de 1,2 tant qu'il n'y a pas d'acide citrique formé. Ce



APPAREIL POUR L'ÉTUDE DES MOISISSURES EN ATMOSPHÈRE CONFINÉE

A. — Volumètre servant, pendant l'expérience, de réservoir d'oxygène.

B. — Cloche mobile terminant le tube manométrique, pouvant se placer sur l'orifice de la trompe ou à côté.

C. — Cloche mobile pouvant se placer sur l'orifice de la pompe à mercure D ou à côté.

E. — Vase de culture.

F. — Tubes absorbants : 1, 2. 5, tubes à acide sulfurique ; 3, tube à potasse ; 4, barbotteur à potasse ; 5, tube à ponce sulfurique.

G — Trompe à mercure du volumètre.

rapport baisse rapidement à mesure que ce composé augmente dans la culture.

Les équations (1) et (2) permettent de prévoir ce résultat, puisque la première comporte une absorption d'oxygène sans dégagement correspondant d'acide carbonique, et que la seconde

entraîne une absorption de 9 molécules d'oxygène pour un dégagement de 6 molécules d'anhydride carbonique seulement.

Il semble donc, à priori, que l'on puisse déduire de l'examen des échanges gazeux des arguments en faveur de l'une ou de l'autre équation, mais pour la raison indiquée plus haut, la conclusion reste indécise.

Le tableau XI donne les variations du quotient respiratoire, suivant les quantités d'acide citrique produit.

Tableau XI.

	Durée de la culture en jours.	Poids du mycélium.	Oxygène absorbé en vol.	Ac. carbonique produit en vol.	$\frac{CO^2}{O^2}$.	Sucre disparu.	Acide citrique formé.	Vol. de la culture.
	—	—	—	—	—	—	—	—
I.	14	0.894	961^{cc},4	1056.7	1.06	3.239	0.671	100 c. c.
II.	30	1.977	3948	3527.8	0.893	10.955	4.573	200 —
III.	45	0.988	2630	2059.1	0.78	7.509	4.002	100 —

Nous avons enfin soumis le mycélium du *C. citricus* à l'hydrolyse acide et alcaline à la température de 120°. Nous n'avons pas pu caractériser l'acide citrique parmi les produits qui se forment dans ces conditions, cela semble indiquer que l'acide citrique n'est pas relié par une simple liaison à la molécule de substance vivante.

CONCLUSIONS

L'acide citrique formé par les citromyces est un produit de désassimilation accidentel qui prend naissance lorsque les milieux de culture épuisés en azote assimilable sont encore riches en aliments ternaires : sucres, glycérine, alcool. Il se présente comme le résultat d'une action protéolytique qui s'exerce dans la cellule âgée et qui permet aux cellules jeunes de leur emprunter l'azote qu'elles ne trouvent plus dans le liquide de culture.

La production d'acide citrique est indépendante de la présence ou de l'absence de l'oxygène ; elle peut être obtenue avec le mycélium jeune placé à l'abri de l'air et maintenu pendant quelques jours à la température de 30°.

Si l'on veut suivre les transformations qui le rattachent à l'alimentation hydrocarbonée, on constate que le sucre est

d'abord dédoublé en alcool et acide carbonique, l'alcool est incorporé à la substance vivante dont les chaînons ternaires s'oxydent peu à peu pour se résoudre en dernier lieu en eau et anhydride carbonique. C'est la marche ordinaire de la combustion dans les conditions de vie normale ; mais lorsque le milieu ne convient plus, la combustion de la substance vivante s'arrête au terme acide citrique. Cet acide semble être caractéristique de la pénurie d'azote, car il ne faut pas oublier qu'il existe bien d'autres moyens de paralyser le développement d'une culture ; si par exemple on cultive les citromyces sur du liquide Raulin additionné d'alcool au lieu de sucre, ce n'est plus l'acide citrique qui se forme en général, mais l'acide oxalique.

D'une manière générale, on peut dire que les acides organiques se présentent comme des produits de désassimilation accidentels et prennent naissance problablement de la même façon que l'acide citrique chez les citromyces. Leur formation peut dépendre d'ailleurs d'influences de même nature : le végétal, dans les conditions ordinaires, règle son alimentation hydrocarbonée, mais il n'a aucune action sur sa nutrition minérale et azotée qui dépendent de la fertilité du sol et aussi de l'activité de la transpiration. L'apport des aliments minéraux n'étant pas régulier, les conditions suivant lesquelles se forme l'acide citrique chez les citromyces sont pour ainsi dire la règle chez les végétaux ; aussi ce sont des producteurs actifs d'acides organiques. En général l'acidité est plus grande le matin que le soir, la nuit que le jour, parce que la transpiration est plus active le jour que la nuit.

M. Amar[1], dans un travail récent, a été conduit également à considérer l'acide oxalique comme un produit de désassimilation.

Nos résultats permettent de conclure en outre que la combustion respiratoire s'exerce sur la molécule vivante même ; le carbone et l'hydrogène ne sont pas brûlés à la façon du charbon dans le foyer d'une machine. Cette localisation, dans les conditions de vie normale, des phénomènes respiratoires, explique l'absence de termes intermédiaires dans les produits de combustion puisque le carbone, l'hydrogène et l'oxygène ne se déta-

1. Amar. *C. R.*, t. CXXXVI, p. 901.

chent de la molécule de substance vivante qu'à l'état d'acide carbonique et d'eau.

On conçoit aussi que l'étude des phénomènes de la combustion respiratoire ne donne aucun résultat appréciable *in vitro*, elle exige probablement, ainsi que nous le faisions remarquer, non seulement la présence de corps oxydables et de l'oxygène, mais encore une organisation qui fait toujours défaut dans les sucs cellulaires tels qu'on les retire des tissus vivants.

De l'influence de l'ingestion des bactéries
ET DES PRODUITS BACTÉRIENS
SUR LES PROPRIÉTÉS DU SÉRUM SANGUIN

PAR LE D[r] A. TCHITCHKINE.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

L'étude de la résorption par l'intestin des produits bactériens et des modifications du sérum sanguin qui peuvent en résulter, présente un intérêt théorique et pratique. Toutefois, cette question est encore loin d'être résolue ; cela ressort des lignes suivantes du Prof[r] Metchnikoff [1] : « Même dans le cas où les microbes restent enfermés dans le contenu intestinal, ils peuvent être nuisibles par leurs produits résorbés dans la circulation. Nous abordons ici un problème difficile, complexe et encore insuffisamment étudié. »

La difficulté de cette étude, qui exige d'assez longues et minutieuses observations, est sans doute la cause principale de son peu d'avancement.

Sur la proposition de M. Metchnikoff, nous avons entrepris, dans le courant du mois de mai 1903, l'étude de cet intéressant problème.

Le but de notre travail est de constater les propriétés acquises par le sérum sanguin d'un animal qui ingère des bactéries ou des produits bactériens.

Pour ces expériences, nous avons choisi le lapin et le bacille de la fièvre typhoïde. Ce choix nous a permis de vérifier en outre les résultats déjà publiés sur la fièvre typhoïde expérimentale du lapin.

Avant d'entreprendre la description de nos propres expériences, exposons sommairement l'état de la question.

Gaffky ayant isolé, pour la première fois en 1884, le bacille

1. Les Microbes intestinaux, *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1903, 6 et 7.

d'Eberth, avait déjà essayé, en faisant ingérer ce microbe, de provoquer la fièvre typhoïde expérimentale chez différents animaux. Mais les résultats de toutes ces tentatives restèrent négatifs.

A. Fraenkel, qui introduisait les cultures typhiques dans le duodénum des cobayes, affirme qu'il a obtenu des résultats positifs dans 7 cas sur 14.

Seitz déclare que, par l'introduction, *per os*, de cultures de bacille typhique ou de déjections typhiques de l'homme, on peut provoquer chez les cobayes une maladie semblable à la fièvre typhoïde humaine, lorsque ces animaux ont été préparés par l'injection de soude ou de teinture d'opium.

Les expériences de Sirotinin[1], faites dans le laboratoire de Flügge, ont donné des résultats négatifs. Sirotinin a fait ingérer à des cobayes des bacilles typhiques. Il pense que les cas de mort survenus dans ses expériences, aussi bien que dans celles de Seitz, sont dus à une intoxication et non à une infection analogue à la fièvre typhoïde naturelle.

Les auteurs qui vinrent ensuite, Remlinger[2], Chantemesse et Ramond[3], communiquent presque simultanément des résultats positifs concernant la fièvre typhoïde expérimentale : Remlinger a fait ses expériences par ingestion sur les rats blancs et les lapins; Chantemesse et Ramond, sur le singe macaque et les lapins. D'ailleurs, ces derniers auteurs ont, comme ils disent, humanisé leurs lapins, en pratiquant sur eux, au préalable, 3 semaines durant, des injections sous-cutanées de sérum humain ou d'urine. Ils mentionnent en outre, mais rien qu'en passant, que le sérum de leurs animaux a agglutiné les bacilles typhiques.

Ainsi, sans insister sur la critique des travaux cités, nous voyons qu'ils ont tous un but commun : obtenir chez les animaux la fièvre typhoïde expérimentale; ils ne touchent presque pas à la question qui nous intéresse.

Passons maintenant à la description de nos propres expériences. Comme nous l'avons dit, c'est exclusivement sur des lapins que nous avons opéré; tout en limitant à cette seule espèce notre expérimentation, nous avons tenté d'étudier les

1. *Zeitschrift für Hygiene* Bd I, 1886, p. 465.
2. *Société de Biologie*, t. V, 1897, p. 713.
3. *Société de Biologie*, 1897, p. 719.

phénomènes de la résorption chez des animaux d'âges différents et placés dans des conditions diverses.

Partant, nos expériences se divisent en 2 catégories par rapport à l'âge des animaux : 1° expériences sur les lapins adultes; 2° expériences sur les petits lapins à la mamelle.

Avec les lapins adultes, nous avons varié nos expériences de la manière suivante :

1° Nous nous sommes servi des lapins en les maintenant dans les conditions ordinaires de leur vie captive (nutrition : son et herbe en été, son et carotte en hiver);

2° En vue d'obtenir des modifications dans leur flore intestinale, nous les avons soumis à un régime spécial : lait et son mélangés;

3° Avant de leur faire absorber des bactéries, nous les avons fait jeûner un certain temps ;

4° Avant de faire ingérer les bactéries par nos lapins, nous avons voulu nettoyer leur intestin au moyen d'un purgatif; mais disons de suite qu'il nous a été impossible de provoquer la purgation soit avec le calomel, le sulfate de soude, le sulfate de magnésie, la cascara sagrada, etc.

Quant au bacille typhique utilisé au cours de nos expériences, il provient de la collection de l'Institut Pasteur. Les bacilles ont été employés à l'état vivant et à l'état de cadavres (émulsion dans l'eau physiologique chauffée à 60° pendant 1 heure). Nous nous sommes servi du filtrat de cultures typhiques en bouillon, d'âges différents (1-5 jours), et aussi d'une toxine typhique préparée par la méthode de M. Besredka.

La virulence de notre microbe était telle que 1/10 de culture sur gélose faisait périr un cobaye.

Exposons maintenant la méthode que nous avons suivie pour introduire les différents produits dans le tube digestif des animaux.

En ce qui concerne les lapins adultes, nous avons eu recours tout d'abord à une sonde élastique qui ne pouvait causer aucune lésion à la muqueuse de l'œsophage. La substance à introduire pénétrait quelquefois dans la trachée et le poumon, et provoquait la mort de l'animal. Pour éviter cet accident et pour nous soustraire à toute critique portant sur la possibilité de lésions accidentelles ou inaperçues de la membrane muqueuse, nou

avons fait manger les bacilles par les lapins en les plaçant dans leur bouche, les animaux les avalaient d'eux-mêmes.

C'est de cette dernière méthode seule que nous nous sommes servi dans nos expériences portant sur les petits lapins.

Ainsi, après avoir introduit différents produits dans le tube digestif, nous observions d'abord l'état général des animaux. Puis, de temps en temps, nous prélevions leur sang, pour examiner leur sérum au point de vue des agglutinines et des précipitines; enfin, nous tenions compte de l'apparition dans le sérum, soit du fixateur (substance sensibilisatricè, ambocepteur), soit des propriétés préventives.

Expériences portant sur les lapins adultes.

I. Dans les conditions normales d'existence.

Avant de commencer l'expérience, on a pesé chaque animal et noté les propriétés agglutinantes de son sérum normal[1]. Chez la moitié des sujets éprouvés, le sérum n'a donné aucune agglutination, chez le quart l'agglutination apparaissait à 1/5 de goutte; chez le huitième restant, à 1/2 goutte; chez un huitième, à 1/10 de goutte, et très rarement à 1/20 de goutte. Ensuite nous commencions à faire ingérer aux lapins soit des cultures vivantes pures, diluées dans l'eau physiologique, soit les mêmes cultures tuées par le chauffage à 60° durant 1 heure. Nous commencions habituellement par ne donner qu'une seule culture sur gélose plusieurs jours de suite ou par intervalles, puis nous avons augmenté peu à peu les doses en arrivant jusqu'à en donner 20 cultures et même plus à la fois. Les animaux étaient soumis à ce traitement pendant plusieurs mois, jusqu'à ce qu'ils fussent sacrifiés ou succombassent à une cause étrangère quelconque. La période d'observation durait au maximum 5 et 6 mois. Cette ingestion ne produisait aucun effet apparent nuisible, ces animaux conservaient leur poids, et leur santé restait satisfaisante. La plupart des lapins ont même augmenté de poids. La température qui, dans quelques expériences, était prise 2 fois par jour, ne présentait pas de variations.

1. Dans notre recherche de l'agglutination, nous nous sommes servi de cultures sur gélose, de 24 heures, diluées dans 20 c. c. d'eau physiologique. Pour chaque épreuve nous prenions 20 gouttes de cette émulsion, en y ajoutant ensuite le sérum à éprouver, commençant par 1 goutte, puis 1/2-1/5-1/10 et ainsi de suite. L'observation était faite à la température du laboratoire.

Remarquons à ce propos que pendant les grandes chaleurs de l'été la température des lapins normaux varie dans d'assez larges limites (de 38°,6 jusqu'à 40°,9 et même 41°,3).

De temps en temps nous prélevions de leur sang et le sérum était examiné ensuite au point de vue des propriétés énumérées plus haut et surtout de l'agglutination. Quelquefois cette dernière apparaissait vers le 9e jour après la première ingestion, mais dans la plupart des cas elle n'apparaissait que plus tard. La force agglutinante du sérum augmentait graduellement et après avoir atteint une certaine intensité (différente chez les différents animaux), elle demeurait stationnaire. Quand l'ingestion cessait, l'intensité agglutinative commençait à diminuer. Le plus fort sérum que nous ayons jamais observé donnait l'agglutination à 1/200 de goutte (dans les conditions décrites plus haut), mais en général le pouvoir agglutinant était moindre. Pour nous, du reste, il était important de constater l'élévation quantitative relative pendant l'ingestion. En réalité, il n'a pas été possible de l'observer sur tous les lapins sans exception. Il y en avait (mais ces cas étaient fort rares) chez qui l'introduction de petites doses ne provoquait aucune augmentation des propriétés agglutinantes du sérum.

Quant aux précipitines sur lesquelles se portait aussi notre attention, elles ne furent constatées que dans quelques sérums et en très faible quantité.

On fit avec minutie la recherche du fixateur (substance sensibilisatrice ambocepteur), selon la méthode de J. Bordet et O. Gengou[1]. Les sérums de tous les animaux furent éprouvés à cet égard.

Il est superflu de dire que toutes les expériences ont été faites dans les mêmes conditions et que tous les sérums ont été comparés au sérum normal.

Dans les sérums dont la force agglutinante n'avait pas encore atteint un assez haut degré d'intensité, il ne fut jamais possible de constater la présence du fixateur.

Les sérums qui agglutinaient au 1/20 de goutte n'en contenaient pas; ceux qui agglutinaient au 1/50-1/100 de gouttes en renfermaient des quantités insignifiantes.

Enfin, avec les sérums agglutinant à 1/100 et surtout à 1/200

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, XV, 1901, p. 289.

de goutte, la réaction de fixation était toujours assez nettement prononcée. Ainsi, nous voyons que l'apparition, aussi bien que l'augmentation de la quantité du fixateur dans nos sérums va parallèlement avec l'apparition de l'agglutinine.

Il nous reste à dire quelques mots sur l'épreuve de nos sérums quant aux propriétés préventives.

Du petit nombre d'expériences que nous avons faites sur les cobayes, il résulte que les sérums de nos animaux ne possèdent pas de propriétés préventives appréciables.

Tels sont les résultats des expériences sur les lapins adultes ayant ingéré des bacilles vivants.

L'ingestion des mêmes bacilles, tués par le chauffage à 60° durant 1 heure, aboutit en somme aux mêmes phénomènes, mais qui apparaissent dans le même ordre avec moins d'intensité. En d'autres termes, l'agglutination n'est pas aussi prononcée que dans les expériences décrites plus haut avec les bacilles vivants. Le sérum le plus actif que nous avons observé agglutinait à 1/50 de goutte.

On peut en dire autant de l'apparition du fixateur. Nulle part il n'est apparu abondamment, bien qu'on puisse néanmoins en constater la présence.

Les sérums ne possédaient aucune propriété préventive. Quant à la dernière série d'expériences relatives à l'ingestion de filtrat des cultures typhiques dans le bouillon et de la toxine de Besredka, nous avons opéré de la manière suivante : après avoir donné aux lapins, tous les jours ou par intervalles, le filtrat par doses d'environ 10 c. c. durant 2-4 mois, nous avons fait ingérer la toxine à ces mêmes animaux, dans le but de savoir si elle renforcerait les propriétés du sérum. Nous n'avons pu constater aucun accroissement. En général, dans ces expériences, bien que les propriétés agglutinantes des sérums se soient manifestées, l'agglutination fut toujours insignifiante (environ 1/20 de goutte). Nous n'avons pas réussi à prouver la présence du fixateur; les sérums ne possédaient pas de propriétés préventives.

II. Le régime du lait mélangé avec du son, où nous introduisions des bacilles vivants, ne change pas essentiellement les résultats. Le mélange de lait et de son suffit à provoquer des déjections liquides. Quant aux propriétés des sérums, leur intensité ne varie en aucune façon.

III. La dernière modification de nos expériences sur les lapins adultes consistait comme il a été dit à faire ingérer les cultures typhiques vivantes ou mortes après un jeûne préalable de 1 ou 2 jours.

Le résultat fut à peu près le même que dans les expériences sur les lapins dans les conditions normales.

EXPÉRIENCES PORTANT SUR LES PETITS LAPINS A LA MAMELLE

Les expériences qui suivent ont été faites sur deux portées de petits lapins. Aux lapins de l'une des portées nous avons fait ingérer des bacilles morts, tués par le chauffage à 60° durant 1 heure. Habituellement nous commençions l'ingestion le 6e jour après la naissance, en nous servant toujours des cultures d'Eberth de 24 heures sur gélose. L'ingestion était opérée de la façon suivante : on raclait la couche superficielle des bactéries à l'aide d'une fine baguette en verre, et on transportait cette couche directement sur la langue des animaux; ou bien, avec de l'eau, on détachait cette couche, puis on centrifugeait l'émulsion d'aspect laiteux qu'on avait obtenue, on décantait le liquide et le culot bactérien était ingéré.

Des 4 lapins de la première portée, 2 sont morts le 14e jour de l'expérience (19e de leur vie), après avoir absorbé, l'un environ 2 cultures et demi (en 3 doses) et l'autre environ 28 cultures (en 9 doses). L'autopsie de l'un et de l'autre n'a relevé aucun changement macroscopique dans les organes. Le tube digestif surtout fut soigneusement examiné sur toute son étendue. Les ensemencements des organes n'ont donné aucune culture.

Quant à deux autres lapins, l'un fut tué par saignée à blanc le 23e jour de l'expérience (28e de sa vie), 13 jours après la dernière ingestion, ayant reçu environ 42 cultures (en 9 doses); l'autre, ayant mangé environ 96 cultures (en 12 doses), fut tué par le même procédé le 39e jour de l'expérience et 13 jours également après la dernière ingestion.

L'autopsie de l'un et de l'autre a démontré que tous les organes étaient macroscopiquement normaux. Les ensemencements des organes n'ont donné aucun résultat.

Le sérum de ces derniers lapins fut examiné par rapport à

l'agglutination et à la présence du fixateur. Quant à l'agglutination, on peut la constater, mais à un très faible degré (1/10 de goutte dans les conditions décrites plus haut). Dans l'un et l'autre cas, il n'y eut pas même trace de fixateur.

6 lapins de l'autre portée recevaient, comme nous l'avons dit, des microbes tués. Les conditions et la méthode d'expérimentation étaient exactement les mêmes que dans le cas précédant, avec cette seule différence que l'émulsion d'aspect laiteux était, avant la centrifugation, chauffée durant 1 heure à la température de 60°.

De ces 6 lapins, l'un mourut le 24e jour de l'expérience, après avoir reçu environ 32 cultures; 2 lapins sont morts le 26e jour, après avoir avalé 77 cultures chacun, et le 4e lapin est mort le 31e jour, après avoir mangé 46 cultures. L'autopsie de ces 4 lapins n'a permis de constater aucune modification appréciable. Les ensemencements des organes, dans un cas seulement (chez le lapin mort le 26e jour), ont donné deux espèces de microbes : un diplocoque et un bacille; tous les autres ensemencements restèrent sans résultat.

Deux lapins furent saignés à blanc : l'un le 21e jour de l'expérience, ayant reçu environ 8 cultures; l'autre, le 22e jour de l'expérience, ayant reçu 25 cultures. Le sérum de ces deux lapins fut examiné au point de vue de leurs propriétés agglutinantes et de la présence du fixateur. Il ne s'est trouvé de fixateur ni dans l'un ni dans l'autre sérum; quant aux propriétés agglutinantes, le sérum du premier lapin n'en possédait aucune, le sérum du second agglutinait à un très faible degré (1/5 de goutte).

Il faut mentionner que, pour la comparaison, nous avons examiné le sérum d'un lapin de lait normal le 30e jour de sa vie. Ce sérum ne différait en rien de celui des lapins en expérience : il agglutinait à 1/5 de goutte.

En résumé, nous pouvons adopter les conclusions suivantes :

1. — Le sérum des lapins adultes normaux aussi bien que celui des petits lapins possède très souvent (dans la moitié des cas) de faibles propriétés agglutinantes pour les bacilles d'Eberth.

2. — Par l'introduction, dans le tube digestif des lapins adultes et des petits lapins, même de grandes doses de bacilles

typhiques vivants, on ne peut pas réussir à provoquer chez les lapins quelque chose de semblable à la fièvre typhoïde de l'homme. La mort de deux petits lapins, observée par nous, s'explique, selon toute probabilité, soit par des causes étrangères inconnues, soit peut-être par la simple intoxication ; cette dernière est d'ailleurs peu probable...

3. — Mais cette ingestion laisse néanmoins des traces dans l'organisme de l'animal. Il s'y opère une résorption des éléments d'origine bactérienne qu'on introduit. La preuve est que le sérum des animaux acquiert de nouvelles propriétés : on peut y constater notamment la présence d'agglutinines, de fixateur et quelquefois de précipitines.

4. — Ces sérums ne possèdent pas de propriétés préventives.

5. — L'ingestion des bacilles typhiques tués par le chauffage donne les mêmes résultats, mais avec une intensité moindre.

6. — Après l'ingestion du filtrat de cultures typhiques en bouillon ou de toxine préparée selon la méthode de Besredka, bien qu'on réussisse à constater dans les sérums seulement l'apparition des propriétés agglutinantes, ces propriétés sont très faibles.

7. — Le régime du lait mélangé avec du son ne provoque aucunement l'apparition renforcée des anticorps dans le sérum.

8. — Le jeûne de 1 ou 2 jours, auquel on a soumis les lapins avant chaque ingestion, ne change pas les résultats.

9. — Le sérum des petits lapins qui ingèrent des bacilles typhiques morts ou vivants n'acquiert aucune propriété nouvelle. Ce fait peut être interprété de deux manières différentes : ou la vraie résorption des produits microbiens ne se produit pas chez les petits lapins, ou bien cette dernière existe, mais l'organisme n'est pas en état d'élaborer de nouveaux produits.

Pour terminer, nous joignons à cet exposé quelques tableaux concernant les expériences décrites.

Nous poursuivons nos recherches dans la même direction, mais en employant cette fois de vraies toxines.

Il nous reste l'agréable devoir d'assurer de toute notre gratitude M. le professeur Metchnikoff qui nous a proposé cette étude et nous a permis de travailler dans son laboratoire.

Nous adressons aussi nos sincères remerciements à M. le docteur Besredka, pour le concours dévoué qu'il nous a prêté au cours de notre travail.

LAPINS ADULTES (6). — *Ingestion de microbes vivants.*

DATE		Jour à partir du début de l'exp.	POIDS	TEMPÉRATURE Matin.	Soir.	NOMBRE de cultures ingérées.	AGGLUTINATION	
Juin.	15	1	1.602	»	38,5	Emulsion de 1 cult.	1 h. 30, 1/5 de goutte de sérum.	
	16	2	»	38,6	39,0	Em. de 1 cult.		
	17	3	»	39,5	39,4	— 1 —	30 m., 1; 1 h., 1/2, 1/5; 3 h., id.	
	18	4	»	38,8	40,4	— 1 —		
	19	5	1.532	39,7	39,6	— 1 —		
	20	6	»	»	39,7			
	22	8	»	39,2	»		15 m., 1/5; 30 m., 1/10; 1 h., 1/20; 20 h., 1/50.	
	23	9	1.545	39,0	»			
	24	10	»	39,4	39,8			
	25	11	»	39,5	39,6			
	26	12	»	39,4	39,9		15 m., 1/50; 30 m., 1/100; 2 h., 1/200; 20 h., id.	
	27	13	»	39,4	40,1			
	29	15	»	39,1	40,1			
	30	16	»	39,1	39,9			
Juillet.	1	17	1.825	39,5	39,9		30 m., 1/100; 1 h. 30, 1/200.	
	2	18	»	39,1	»			
	3	19	1.960	39,2	»	— 1 —		
	4	20	»	39,2	39,8			
	6	22	»	»	40,0			
	7	23	»	39,5	39,7	— 1 —		
	8	24	»	39,5	39,8			
	9	25	»	39,4	39,6			
	10	26	»	39,6	»			
	11	27	»	»	39,7	— 1 —		
	13	29	»	39,3	»			
	15	31	»	39,2	39,9			
	16	32	»	39,4	»		15 m., 1/20; 1 h., 1/100; 1 h. 30, 1/200.	
	17	33	»	»	39,8			Saignée d'essai.
	23	39	»	»	»		1 h., 1/50; 2 h., 1/200.	
	24	40	»	»	»	— 2 —		
Août.	1	48	»	»	»	— 1 —		
	7	54	»	»	»	— 1 —		
	20	67	»	»	»		20 m., 1/20; 1 h. 30, 1/100; 4 h., 1/200; 20 h., id.	
	24	71	2.720	»	»	— 4 —		
	31	78	»	»	»	— 4 —		
Septembre.	8	86	»	»	»	— 10 —		
	14	92	2.795	»	»	— 10 —		
	18	96	»	»	»		50 m., 1/20; 20 h., 1/50, 1/100, 1/200.	
	21	99	»	»	»	— 10 —		
	25	103	»	»	»	— 20 —		
	29	107	2.805	»	»	— 20 —		
Octobre.	16	124	2.955	»	»		20 h., 1/100.	
	20	128	»	»	»		30 m., 1/5; 1 h., 1/20; 20 h., 1/20, 1/50, 1/100.	
	22	130	»	»	»	— 13 —		Saignée d'essai.
	26	134	»	»	»			
Nov.	5	144	»	»	»	— 20 —		
	9	148	»	»	»			

LAPINS ADULTES (19). — *Ingestion de microbes morts.*

DATE	Jour à partir du début de l'exp.	POIDS	NOMBRE de cultures ingérées.	AGGLUTINATION	
Sept. 8				30 m., 1/2; 1 h. 30, 1/5; 3 h., 1/10; 20 h., 1/10.	
— 9	1	2.075	Em. de 2 cult.		
— 10	2	»	— 2 —		
— 11	3	»	— 2 —		
— 12	4	2.000	— 3 —		
— 14	6	»	— 3 —		
— 15	7	»	— 3 —		
— 17	9	»	— 3 —		
— 18	10	»	— 3 —		
— 19	11	»	— 3 —		
— 21	13	»		30 m., ; 1 h. 1/4, 1/2; 2 h., 1/5; 3 h., 1/10; 20 h., 1/20, 1/50, 1/100.	
— 23	15	»	— 6 —		
— 28	20	2.055	— 14 —		
Oct.. 17	39	2.230		15 m., 1/10; 1 h., 1/20; 1 h. 15, 1/50; 20 h., 1/100.	
— 26	48	»	— 16 —		
Nov. 5	58	»			Saignée d'essai.
— 10	63	»	— 20 —		
— 17	70	»	— 20 —		
Déc.. 1	84	»	— 12 —		
— 15	98	»		30 m., 1/10; 1 h. 15, 1/50; 2 h., 1/50; 20 h., 1/100, 1/200.	Saignée d'essai.

LAPINS ADULTES (22). — *Ingestion de microbes vivants.*

DATE	Jour à partir du début de l'exp.	POIDS	NOMBRE de cultures ingérées.	AGGLUTINATION	
Sept. 10		»		0.	
— 11	1	»	Em. de 1 cult.		
— 12	2	»	— 2 —		
— 14	4	2.215	— 3 —		
— 15	5	»	— 3 —		
— 16	6	»	— 3 —		
— 17	7	»	— 3 —		
— 18	8	»	— 3 —		
— 19	9	»	— 4 —		
— 21	11	»	— 4 —		
— 24	14	»	— 6 —		
— 28	18	2.490	— 15 —		
Oct.. 19	39	2.600		30 m.. 1; 2 h., id., 20 h., 1/5.	
— 26	46	»	— 13 —		
— 31	51	»	— 26 —		
Nov. 5	56	»	— 20 —		
— 12	63	»	— 20 —		
— 24	75	»		20 m., 1/5; 1 h. 20. 1/10; 4 h., 1/20; 20 h., 1/20, 1/50.	Saignée d'essai.
Déc.. 10	91	»			

MAL DE CADERAS

CHEZ LES ANIMAUX DOMESTIQUES ET SAUVAGES

(*ÉPIDÉMIES PARALLÈLES*)

Par les Drs M. ELMASSIAN et E. MIGONE

Malgré l'apparition, dans ces derniers temps, de nombreux travaux sur le mal de Caderas, l'important problème de son mode de propagation n'a pas encore reçu sa solution définitive. Le rôle vecteur des Diptères ailés a été parfois soutenu ; mais cette théorie manque jusqu'ici de bases positives.

Nous avons déjà exposé ailleurs [1] des faits qui sont contraires à cette manière de voir, sans pouvoir, du reste, lui en opposer une autre. Pour effectuer une série d'expériences sur les champs infectés mêmes, nombreux au Paraguay, il nous aurait fallu des installations très coûteuses, pour le moment inabordables eu égard aux ressources modiques de notre Institut.

Dans cet ordre d'idées, nous nous proposons d'exposer en quelques lignes l'histoire d'une épidémie produite à la fois sur les animaux domestiques et sauvages d'une localité. Elle montre la corrélation étroite qui existe entre ces deux séries d'infections parallèles, et elle permet de comprendre l'origine, jusqu'ici très obscure, des épidémies spontanées et localisées au milieu des régions désertes.

* * *

L'un de nous (Migone) possède sur le lac d'Ipacarai (Paraguay), — plus exactement sur un des côtés de la petite rivière qui relie ce lac au Rio Paraguay et qui porte le nom de Rio Salado, — une propriété où se pratique l'élevage des bœufs et des chevaux. Cette propriété a la forme d'un rectangle allongé, et est limitée d'un côté par ce Rio Salado, dont les environs très marécageux sont infestés d'innombrables carpinchos (*Hydrochoerus capibara*), et de l'autre côté par une forêt vierge inextricable. Les deux extrémités de ce rectangle sont fermées par des fils de fer tendus horizontalement (alambrado). La

1. Ces *Annales*, t. XVII, 1903.

région, bien que très insalubre pour les chevaux, n'a pas présenté de mal de Caderas depuis 8 ans, en dépit de quelques cas constatés de temps à autre aux environs.

L'année dernière (1903), en mars-avril, les domestiques de la ferme se mirent à chasser des carpinchos pour en vendre la peau et laissèrent manger leurs cadavres aux chiens chasseurs; ils périrent les uns après les autres; les autres chiens et les chevaux de l'élevage restèrent en bonne santé.

Dans les premiers mois de cette année (1904), une nouvelle chasse fut organisée, et cette fois encore, suivant la coutume, les chiens dévorèrent les cadavres encore chauds : nouvelle épizootie sévissant sur les chiens chasseurs à l'exclusion des autres; cette fois, 2-3 mois plus tard, le mal de Caderas apparaît sur les chevaux avec des allures très alarmantes. Ne pouvons-nous pas en tirer une preuve à l'appui de notre thèse? Puisque tous les chiens vivent ensemble et sont exposés à la piqûre de tous les insectes ailés; il semble bien que ces insectes sont incapables de propager la maladie. On peut penser aussi que l'origine de l'infection chez les chevaux n'est pas les chiens contaminés, mais bien l'épidémie des carpinchos.

Nous avons pu avoir dans notre laboratoire, aux différentes époques de l'épidémie que nous rapportons, plusieurs chiens et chevaux malades provenant de la propriété citée, et toujours il nous a été facile d'établir chez eux l'existence du Trypanosome du mal de Caderas.

Il semble résulter de ce qui précède que les carpinchos paient un large tribut à la Trypanosomiase. Elle doit être chez eux à l'état latent, comme la peste chez les rats; plus résistants que les autres espèces sensibles, ils doivent servir d'agents de conservation pour le Trypanosome, durant des mois et des années entières. Ainsi s'explique le fait de la mortalité des chiens ayant ingéré la viande de carpinchos ne paraissant pas malades. Arrive-t-il des circonstances favorables pour la transmission du Caderas de ces derniers aux chevaux, nous aurons alors sous les yeux deux infections parallèles dont l'une, selon nous, sera la conséquence de l'autre. Tels sont, du moins, les commentaires que l'on peut tirer logiquement des faits observés. Nous ne voyons pas d'autre manière d'expliquer l'éclosion soudaine d'un foyer de mal de Caderas dans une localité isolée, à plusieurs

kilomètres de distance de toute agglomération équine.

Plus d'une fois, étant invités à rechercher l'origine d'un de ces foyers, nous avons pu découvrir, dans les champs infectés, quelques petits ruisseaux où les carpinchos avaient élu domicile et où ils venaient mourir, comme l'indiquait la présence de plusieurs tas de leurs ossements sur les rives. Les chevaux qui, par la nécessité même de s'abreuver, ne peuvent pas s'éloigner des cours d'eau, sont ainsi exposés à la contagion.

Quant à la question de la transmission du mal entre équins, et aussi et surtout des carpinchos à ces derniers, on est réduit à des hypothèses.

Examinons tout d'abord les mœurs si bizarres de ces amphibies, et nous verrons qu'il y a là plus d'un détail des plus intéressants pour nous.

Les carpinchos choisissent, pour y vivre, les zones de terrains à proximité des rivières et des lacs, par conséquent recouvertes de vastes nappes d'eau et d'une luxuriante végétation aquatique. Tous les jours, à la tombée de la nuit, ils sortent de ces endroits marécageux pour aller sur les parties assez sèches des rives où ils trouvent un pâturage plus tendre. C'est aux mêmes heures que le bétail vient pour s'abreuver et se baigner. Étant donné le caractère farouche des carpinchos, on admet difficilement leur mélange avec d'autres espèces. Il n'y a pourtant qu'à ce moment de la journée que la contagion puisse être réalisée.

Les seuls vecteurs ailés que l'on puisse incriminer à cette heure nocturne sont les moustiques qui n'ont pas encore été, que nous sachions, mis en cause. Des moustiques recueillis sur des rives infectées, broyés et inoculés aux espèces sensibles n'ont pas produit le mal de Caderas, mais lors même que les Culicides auraient un rôle actif dans ce cas, on n'en pourrait pas déduire qu'il en est de même dans la transmission de l'affection de cheval à cheval. Son épidémiologie telle que nous la connaissons s'y oppose formellement.

Tuberculose osseuse et troubles circulatoires et trophiques

Par le Dr N. PÉTROFF (de Saint-Pétersbourg.)

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

L'influence des troubles trophiques et vasomoteurs sur l'apparition des foyers locaux dans les maladies infectieuses est très peu étudiée. Des recherches sur les phénomènes dus à cette influence, ont été faites par Herman[1], Kasparek[2] et Hofbauer et Czychlarz[3] pour les infections pyogènes.

Leurs travaux semblent avoir démontré que la congestion artérielle pure et simple (section du sympathique abdominal), ainsi que la congestion, suivie de troubles de nutrition (section du sciatique), favorisent la localisation dans la patte d'un lapin ainsi énervée, des germes infectieux (staphyl., streptoc., pneumoc.), introduits dans le système circulatoire par la veine de l'oreille, par exemple.

Vérifier ces données par de nouvelles expériences, concernant cette fois-ci l'infection tuberculeuse, tel fut le but de mon travail.

Trois séries d'expériences furent exécutées à cet effet sur des lapins. Les deux premières consistaient respectivement en la section du sympathique abdominal et en celle du sciatique, la troisième en la ligature de la veine crurale. Toutes ces expériences furent suivies d'injections d'un virus tuberculeux très actif dans les veines de l'oreille des animaux.

A l'autopsie, nous pratiquâmes toujours un examen très attentif des articulations et de la moelle des os longs des deux pattes postérieures de chaque animal. Des fragments de cette moelle furent, en outre, régulièrement soumis à l'examen microscopique en frottis et en coupes.

Les résultats de ces expériences peuvent être résumés en

1. Herman, De l'influence de quelques modifications... (*Annales Pasteur*, 1891.)

2 Kapsarek, Ueber den Einfluss des Nerwensystems... (*Wien. klin. Woch.*, 1895, n° 32-3.)

3. Hofbauer und Czychlarz, Ueber die Ursachen... (*Centralbl. f. allgem. Pathol.*, 1898, nos 16,17.

quelques mots : pas une seule fois il n'y eut de préférence de localisation tuberculeuse pour la patte énervée ou congestionnée. Dans les cinq cas où des foyers tuberculeux purent être découverts dans les extrémités postérieures, ils se trouvaient situés symétriquement du côté intact, aussi bien que du côté opéré.

Donc, aucune des conditions réalisées dans nos expériences ne suffit à provoquer l'apparition d'un foyer local de tuberculose dans l'endroit troublé. Ces conditions étaient les suivantes : congestion artérielle simple (section du sympathique, 11 expériences réussies [1]), congestion veineuse simple (ligature de la veine crurale, 8 expériences réussies), congestion artérielle, suivie de troubles trophiques graves, allant parfois jusqu'à la formation de véritables ulcères trophiques (section du sciatique, 12 expériences réussies).

A côté de ces résultats négatifs nous avons à noter un résultat positif très intéressant. Il concerne un lapin, ayant subi le jour même de l'opération (section du sympathique), une fracture de la cuisse. A l'autopsie de l'animal, mort de tuberculose généralisée, le foyer de la fracture représentait un hématome considérable, un sac clos, rempli de caillots et à la paroi entièrement recouverte de granulations frêles, grisâtres, criblées de tubercules. La moelle osseuse et les articulations de toutes les autres extrémités ne contenaient pas de tubercules.

Il paraît donc clairement démontré par cette expérience et par d'autres expériences analogues, rapportées dans ma thèse [2], que la rupture des vaisseaux, avec effusion sanguine dans les tissus, constitue réellement une condition prédisposante à la localisation du virus tuberculeux, circulant dans le sang.

Quant au peu d'influence que paraissent exercer sur la localisation de la tuberculose les troubles vasomoteurs et trophiques, cette particularité peut être mise à profit pour l'explication de la différence des lieux d'élection coutumiers à la tuberculose osseuse et à l'ostéomyélite aiguë.

L'ostéomyélite, maladie essentiellement commune à l'âge de croissance, frappe le plus souvent les extrémités juxta-épiphy-

1. Nous désignons comme réussies les expériences où les animaux moururent avec une tuberculose indiscutable des organes internes.

2. Pétroff. Thèse de Saint-Pétersbourg, 1902. (Pages 41 et 47 et figures 1 et 2, en russe.)

saires des diaphyses. Ces endroits sont le siège de phénomènes de prolifération très intenses [1] et, comme tels, ils sont particulièrement sensibles à toutes sortes de troubles nutritifs et circulatoires. Or, ces troubles, comme nous l'avons vu (travaux de Herman, Kasparek, Hofbauer et Czychlarz), favorisent la localisation des microbes pyogènes.

La tuberculose montre sa prédilection pour les épiphyses des os longs. La prolifération y est moins intense et par conséquent les troubles de nutrition et de circulation y sont moins ressentis. Aussi ne sont-ce pas ces troubles qui préparent l'apparition de foyers tuberculeux ; ce seraient plutôt les traumatismes si fréquents et passant souvent inaperçus avec leur conséquence presque fatale : la rupture de vaisseaux sanguins, qui n'ont pas ici, comme dans les diaphyses, une couche musculaire pour les protéger.

Je ne voudrais nullement exagérer la portée de ces expériences. Plus d'une cause, inconnue encore, doit exercer son influence sur la localisation de la tuberculose osseuse ; n'empêche que les faits indiqués aient leur importance, qui sera précisée, je l'espère, par des recherches à venir.

1. Il est connu que les processus de prolifération sont beaucoup plus intenses du côté de la surface diaphysaire que du côté de la surface épiphysaire des « cartilages épiphysaires ».

Le Gérant : G. Masson

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE OCTOBRE 1904 N° 10

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Les propriétés des antisensibilisatrices ET les théories chimiques de l'immunité

Par le Dr JULES BORDET

Directeur de l'Institut Pasteur de Bruxelles.

Parmi les questions qui se rattachent à l'étude de l'immunité, celle de la spécificité des sérums est au nombre des plus importantes et aussi, il faut le reconnaître, des plus difficiles à résoudre. Le problème est fort complexe. Les anticorps qu'on trouve dans les immunsérums sont, on le savait depuis longtemps, spécifiques, en ce sens qu'ils agissent sur certains éléments, et non sur d'autres. Mais, à côté de cette spécificité d'action, il semble bien qu'on doive leur reconnaître, en outre, une spécificité d'origine. Par exemple, il convient de définir une sensibilisatrice quelconque (ambocepteur, fixateur) non seulement en désignant le globule ou le microbe qu'elle impressionne, mais encore en précisant l'espèce animale qui l'a élaborée. Deux sensibilisatrices, actives toutes deux contre le vibrion cholérique, mais dont l'une provient du lapin et l'autre du cobaye, ne se comporteront point, en toute circonstance, d'une manière complètement identique ; il en est de même pour ce qui concerne les sérums antitoxiques. On sait notamment que la durée de l'immunité passive conférée par un sérum préventif varie suivant que ce sérum provient d'un animal semblable à celui qu'on injecte, ou d'un organisme appartenant à une espèce différente.

L'étude des antisensibilisatrices est tout particulièrement susceptible de nous documenter à ce point de vue de la spécificité des sérums, et notamment de nous apprendre si cette propriété est aussi stricte et absolue qu'on pourrait le supposer. *A priori*, il est assez rationnel de prévoir que c'est à propos des antisensibilisatrices (ou, d'une manière plus générale, des anticorps) que la loi de la spécificité apparaîtra avec le plus d'évidence. Elles agissent en effet sur des substances qui, étant aussi des anticorps, sont elles-mêmes spécifiques et le sont, comme nous venons de le rappeler, au double titre de l'action et de la provenance. On a donc bien des chances, en les considérant, de voir la spécificité se manifester de la façon la plus curieuse et la plus instructive.

C'est en vaccinant des animaux contre un sérum hémolytique que l'on put signaler l'apparition d'une antisensibilisatrice dans le sang de l'organisme traité. Après avoir montré [1], en 1899 (à la suite des travaux de Camus et Gley, Kossel, sur l'antitoxine du sérum d'anguille), que si l'on injecte à un animal d'espèce A (lapin) du sérum d'espèce B (poule), cet animal A fournit bientôt un sérum capable de neutraliser le pouvoir hémolytique du sérum B à l'égard des globules d'espèce A, nous fîmes connaître ensuite, d'une manière plus détaillée, les propriétés des sérums antihémolytiques [2]. Ayant injecté à des lapins du sérum hémolytique spécifique, provenant de cobayes immunisés au préalable contre les globules rouges de lapin, nous constatâmes que ces lapins fournissaient un antisérum capable de paralyser l'influence hémolytique de ce sérum spécifique de cobaye, et qui, chose assez remarquable, dirigeait son activité à la fois contre les deux substances intervenant dans l'hémolyse. D'une part, en effet, il annihilait la sensibilisatrice caractérisant le sérum hémolytique de cobaye; de l'autre, il se montrait antitoxique à l'égard de l'alexine de cobaye (pouvoir antialexique). Etant antialexique, cet antisérum protégeait contre l'alexine (cytase, complément) de cobaye non seulement les hématies de lapin, mais aussi des éléments sensibles quelconques, tels que des microbes. Par exemple, des

1. Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum, 2e mémoire. Ces *Annales*, avril 1899.

2. Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines, etc. Ces *Annales*, mai 1900.

vibrions cholériques sensibilisés par du choléraserum (de provenance quelconque, mais préalablement privé de son alexine propre, grâce au chauffage à 55°) pouvaient, sans se transformer en granules, être transportés dans du sérum frais de cobaye, pourvu que celui-ci eût été additionné d'une dose convenable de l'antisérum [1]. Bref, l'addition d'antisérum à l'alexine de cobaye abolissait toutes les manifestations — soit hémolytiques, soit bactéricides — de cette substance. L'antialexine était nettement spécifique; elle n'exerçait point d'influence sur les propriétés hémolytiques ou bactéricides des sérums provenant de la plupart des animaux autres que le cobaye.

Le pouvoir antialexique de pareils antisérums fut étudié ensuite par divers observateurs. M. Wassermann, notamment, put confirmer l'expérience, ci-dessus rappelée, du rôle antibactéricide de l'antialexine; il y apporta même une modification intéressante. Au lieu de neutraliser *in vitro*, par l'antisérum approprié, l'alexine du sérum frais, il opéra *in vivo* : injectant l'antisérum dans le péritoine, il put annihiler, dans la cavité même, chez l'animal vivant, le pouvoir bactéricide de l'exsudat.

Quant au pouvoir antisensibilisateur, c'est surtout dans ces derniers temps qu'il a vivement intéressé les expérimentateurs. Nous nous en occuperons particulièrement et aurons l'occasion, au cours du présent mémoire, de rappeler les faits qu'ils ont consignés.

I

PROPRIÉTÉS DES ANTISENSIBILISATRICES

Pour étudier fructueusement les antisensibilisatrices, il faut tout d'abord être en possession d'un cas favorable, d'un exemple se prêtant bien aux expériences. Le pouvoir antisensibilisateur n'est souvent que faiblement développé dans les antisérums; parfois même, on ne peut le déceler qu'à l'aide d'une technique un peu délicate; en outre, on est en pareil cas forcé d'employer, pour neutraliser efficacement une quantité

1. Cet antisérum devait, bien entendu, avoir été privé de son alexine propre par le chauffage à 55°. Cette température respecte l'antialexine qui, dans cette expérience, protège les vibrions contre l'alexine de cobaye.

donnée de sensibilisatrice, des doses fort élevées d'antisérum, et cette nécessité constitue souvent un réel obstacle à la commodité et au succès des expériences.

Il faut donc que l'on dispose d'un antisérum dont le pouvoir antisensibilisateur soit accusé; il faut aussi que la sensibilisatrice contre laquelle l'antisérum est actif soit elle-même énergique. Il est nécessaire en outre que les sérums neufs provenant des espèces animales identiques à celles qui fournissent respectivement la sensibilisatrice ou l'antisensibilisatrice soient aussi inactifs que possible; ils interviennent en effet à titre de témoins de comparaison, chargés de mettre en relief les propriétés spéciales des immunsérums.

Ces conditions sont réalisées d'une manière très satisfaisante dans l'exemple que nous avons choisi, et qui est le suivant :

La sensibilisatrice que nous ferons le plus souvent intervenir est du sérum de *lapins* qui ont été soumis, au préalable, à 3 ou 4 injections de 5 à 7 c. c. de *sang défibriné de bœuf*. Nous emploierons aussi, dans certaines expériences, du sérum de lapins immunisés contre d'autres globules, tels que ceux de poule ou d'homme. L'antisensibilisatrice est du sérum de *cobayes* qui ont reçu, au préalable, à 12-15 jours environ d'intervalle, 2 ou 3 injections de 3 à 5 c. c. de *sérum de lapin neuf*. On les saigne 15 jours après la dernière injection.

Avant de servir aux expériences, ces sérums sont privés de leur alexine par un chauffage d'une demi-heure à 55-56°. Cette température respecte, on le sait, la sensibilisatrice et l'antisensibilisatrice. Pour plus de simplicité, nous désignerons les sensibilisatrices sous les noms de sérums « lapin-bœuf 56° », « lapin-poule 56° », « lapin-homme 56° », et l'antisensibilisatrice sous le nom de « antisérum cobaye-lapin 56° ». Les sérums témoins seront naturellement : sérum lapin neuf 56°, sérum cobaye neuf 56°.

Comment faut-il instituer les expériences susceptibles de mettre en évidence le pouvoir antisensibilisateur? *A priori*, on peut recourir à deux méthodes fort différentes.

En premier lieu, on peut mélanger tout d'abord la sensibilisatrice et l'antisérum, ajouter après un certain temps les globules qui servent de réactif, et rechercher ensuite si ces éléments sont, grâce à l'antisérum, à l'abri de la sensibilisation à

l'influence de l'alexine. Cette manière de procéder a été fréquemment adoptée par les auteurs. Elle fait intervenir l'antisérum à titre préventif, puisque la sensibilisatrice est neutralisée avant d'avoir impressionné les globules.

Mais on peut tenter, d'autre part, de guérir par l'antisérum des globules déjà touchés par la sensibilisatrice. Des essais de ce genre ont été réalisés par Pfeiffer et Friedberger [1], qui opéraient non sur des globules, mais sur des microbes. Les expériences ainsi conçues sont fort comparables à celles que Madsen [2], Kraus et Lipschütz [3] instituaient lorsqu'ils guérissaient, par l'addition d'antitoxines appropriées, des globules déjà intoxiqués par des poisons bactériens.

C'est ce second mode opératoire qui nous a paru mériter la préférence. Il permet, en effet, de faire agir l'antisérum sur une sensibilisatrice déterminée, à l'exclusion de toute autre. A côté de la sensibilisatrice spécifique, le sérum lapin-bœuf contient vraisemblablement soit une, soit (d'après certains auteurs) un grand nombre de substances analogues, mais qui sont normales et préexistaient, avant l'immunisation, dans les humeurs de l'animal neuf. Si l'on commence par mélanger l'antisérum et le sérum lapin-bœuf, il est à présumer que ces sensibilisatrices normales participeront à la réaction. Mais si l'on a soin de mettre d'abord en contact le sérum sensibilisateur et les globules de bœuf, de laver ensuite ceux-ci dans un grand volume d'eau physiologique pour éliminer le sérum en excès, puis de les introduire (ainsi chargés de la substance active spécifique qui électivement s'est fixée sur eux) dans l'antisérum, ce dernier rencontrera uniquement la sensibilisatrice spécialement appropriée à ce genre d'hématies et qui leur est combinable.

Reste à choisir l'alexine. Elle ne doit, bien entendu, être aucunement annihilée ou affaiblie par l'antisérum. Le plus simple est donc de faire intervenir le sérum frais de cobaye neuf, c'est-à-dire de l'espèce animale qui a fourni l'antisérum ; on peut prévoir, ce qui est confirmé par l'expérience, que ce

1. *Centrabaltt für Bakteriologie*, Orig., t. XXXIV, p. 72.
2. *Zeitschrift für Hygiene*, t. XXXII.
3. *Idem*, t. XLVI, p. 49.

dernier ne nuira pas à cette alexine. D'autre part, celle-ci s'accorde très bien avec les sensibilisatrices employées [1].

Voici comment, d'après ces données, on met en évidence l'influence antisensibilisatrice :

On prépare tout d'abord, d'une part du sang sensibilisé, d'autre part du sang non sensibilisé destiné à servir de contrôle. On verse dans deux larges tubes 1 c. c. de sang de bœuf lavé à l'eau physiologique [2]. Dans le tube A, on introduit ensuite 2 c. c. de sérum lapin-bœuf 56°, et dans le tube B, 2 c. c. de sérum lapin neuf 56°. Environ une demi-heure après, on remplit les deux tubes d'eau physiologique, on agite et on centrifuge. On décante par aspiration la totalité des liquides, et on ajoute aux sédiments de globules, pour les délayer, 3 c. c. de la solution physiologique. Les deux émulsions de globules obtenues ne diffèrent donc l'une de l'autre qu'en ce que, dans la première, les hématies se sont chargées de la sensibilisatrice spécifique et lui servent de véhicule. Préparons maintenant les mélanges suivants :

Tube *a*. — On y introduit 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé, et 3/10 de centimètre cube d'antisérum cobaye-lapin 56°.

Tube *b*. — Identique au précédent, sauf que l'antisérum est remplacé par du sérum de cobaye neuf 56° en quantité égale.

Tubes *c* et *d*. — Respectivement identiques aux tubes *a* et *b*, sauf qu'ils contiennent du sang non sensibilisé.

On attend une heure environ, puis on ajoute aux quatre tubes 1/10 de centimètre cube de sérum non chauffé, et récemment obtenu, de cobaye neuf (alexine).

On constate alors que l'hémolyse s'effectue très rapidement, en quelques minutes, dans le tube *b*. Dans les tubes *a*, *c*, *d*, les globules sont encore intacts après 24 heures. L'absence d'hémolyse dans le tube *a* est bien due à la neutralisation de la sensibilisatrice par l'antisérum. En effet, si l'on ajoute ultérieurement au tube *a* un peu de sérum lapin-bœuf 56°, on fait ap-

1. L'alexine d'homme convient également fort bien.

2. Ce sang lavé est « ramené à volume normal », c'est-à-dire qu'il est aussi riche en globules que le sang défibriné primitif. On verse dans un tube une petite quantité de sang défibriné, s'élevant à une hauteur qu'on note par un trait sur le verre. On remplit d'eau physiologique, on centrifuge, on aspire la totalité du liquide, et l'on ajoute de l'eau physiologique jusqu'à rétablissement du volume primitif.

paraître l'hémolyse ; d'autre part, on peut, avec les mêmes résultats, réaliser l'expérience ci-dessus résumée en remplaçant l'alexine de cobaye par une autre alexine (sérum humain par exemple) également insensible à l'action de l'antisérum.

L'expérience permet de mesurer la puissance antisensibilisatrice de l'antisérum. Au lieu de mélanger, à 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé, 3/10 de centimètre cube d'antisérum pur, ajoutons, à la même dose de ce sang, 3/10 de centimètre cube d'antisérum préalablement dilué dans un volume plus ou moins grand de sérum de cobaye neuf 56°. On constate, par de semblables essais, que les antisérums provenant des différents cobayes traités ont une énergie très inégale. Le pouvoir neutralisant est parfois suffisamment accusé pour que 1/10 de centimètre cube d'antisérum préserve entièrement 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé contre l'influence alexique.

La technique étant établie, proposons-nous maintenant de répondre aux questions qui se présentent naturellement à l'esprit à propos des antisensibilisatrices : les unes (B, C, D, E) se rapportent plus spécialement à l'action de l'antisérum sur la sensibilisatrice. Les autres (A, F) se rattachent plutôt au problème de l'origine et de la diversité des anticorps :

A.) Un antisérum obtenu à la suite d'injections, à un animal d'espèce A, de sérum provenant d'un animal d'espèce B *qui n'a subi aucune immunisation* (sérum neuf), est-il capable de neutraliser efficacement les *sensibilisatrices spécifiques* que l'espèce B élabore lorsqu'on l'immunise contre certains éléments tels que des globules rouges ? L'expérience relatée répond affirmativement, puisque nos cobayes fournisseurs d'antisérum (lequel neutralise la sensibilisatrice spécifique lapin-bœuf) n'ont reçu que du sérum de lapin neuf. D'autre part, le résultat est identique si l'on remplace le sang de bœuf par du sang de poule ou d'homme, respectivement sensibilisés par les sérums spécifiques lapin-poule ou lapin-homme. Il y a à cet égard concordance complète avec les données antérieures de divers auteurs, notamment de M. Ford [1]. Ce savant — après avoir constaté que les hématies de poule sont agglutinées non seulement par le sérum de lapins immunisés contre le sang de poule, mais aussi, à un certain degré, par le sérum de lapin neuf — injecte

1. *Zeitschrift für Hygiene*, t. XL, 1902, p. 363.

à des poules, d'une part, du sérum normal de lapin; de l'autre, du sérum spécifique de lapins préalablement injectés de sang de poule (sérum lapin-poule). Il constate que chaque antisérum de poule, ainsi obtenu, neutralise indifféremment soit l'agglutinine spécifique de l'immunsérum lapin-poule, soit l'agglutinine normale du sérum de lapin neuf. MM. Pfeiffer et Friedberger [1] ont obtenu des résultats analogues en opérant sur des sérums actifs à l'égard non de globules, mais de microbes (choléra).

On peut donc admettre, en coordonnant ces résultats, qu'en règle générale l'*antisérum obtenu à la suite d'injections de sérum neuf* d'espèce A, et qui atteint les anticorps normaux, *peut neutraliser aussi les différents anticorps spécifiques* que cette espèce A élabore sous l'influence des traitements immunisants.

B.) L'antisensibilisatrice *se consomme-t-elle en agissant*, à l'exemple de tous les anticorps étudiés jusqu'à présent? En d'autres termes, un volume donné d'antisérum ne peut-il neutraliser qu'une dose limitée de sensibilisatrice? Il est presque superflu de dire que la réponse à cette question est affirmative; il existe une dose minimale au-dessous de laquelle l'antisérum ne protège plus les globules sensibilisés. Au surplus, on peut démontrer que l'introduction dans l'antisérum d'une quantité suffisante de globules de bœuf sensibilisés (traités d'abord par le sérum lapin-bœuf 56°, puis lavés) dépouille cet antisérum de son pouvoir antisensibilisateur; le liquide surnageant, décanté après centrifugation, n'abolit plus la sensibilisation de nouveaux globules [2]. Bien entendu, si l'on traite l'antisérum par la même dose de globules non sensibilisés (mélangés d'abord à du sérum de lapin neuf 56°, puis lavés), le pouvoir antisensibilisateur persiste dans le liquide.

C.) L'antisérum représente-t-il une antitoxine vraie, *neutralisant directement* la sensibilisatrice, ou bien contrarie-t-il simplement, grâce à une action antagoniste quelconque, les effets de cette substance? Dans cet ordre d'idées, il y a lieu de rechercher si des globules sensibilisés, puis guéris par l'antisérum, peuvent être soumis au lavage par l'eau phy-

1. *Berliner Klin. Wochenschrift*, 1902, n° 1, et *Centralblatt für Bakteriologie*, t. XXXIV, 1903, p. 74.

2. L'expérience sera décrite en détail plus loin, à propos d'une autre question.

siologique, tout en restant réfractaires aux effets d'une addition ultérieure d'alexine.

L'expérience répond par l'affirmative. Mélangeons d'une part 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé et 3/10 de centimètre cube d'antisérum; d'autre part 1/10 de ce même sang et 3/10 de centimètre cube de sérum de cobaye neuf (chauffé à 56°). Au bout d'un certain temps, remplissons les tubes de solution physiologique, centrifugeons, décantons tout le liquide[1] et délayons les deux sédiments de globules dans 3/10 de centimètre cube de sérum de cobaye neuf 56°. Introduisons alors de l'alexine (1/10 de centimètre cube de sérum frais de cobaye neuf). Pas d'hémolyse dans le tube qui a contenu l'antisérum ; hémolyse très rapide dans l'autre. La guérison des globules *ne réclame donc pas leur contact permanent* avec l'antisérum.

D.) L'antisérum supprime-t-il, dans ses diverses manifestations, l'influence de la sensibilisatrice? La propriété la plus essentielle de celle-ci est de rendre les éléments impressionnés (globules, microbes, etc.) très sensibles à l'action destructive de l'alexine. Mais, comme nous l'avons montré[2], les sensibilisatrices possèdent aussi la propriété (laquelle est du reste corrélative de la première) de conférer aux globules, etc., appropriés, le pouvoir d'absorber énergiquement l'alexine, et d'en dépouiller ainsi le liquide ambiant. Il y a lieu, en conséquence, de rechercher si des *globules sensibilisés, puis traités par l'antisérum, fixeront encore l'alexine*. Or, l'expérience montre que dans ces conditions, *l'alexine n'est plus absorbée*.

Du sang défibriné de bœuf (au sérum duquel on a substitué comme d'habitude, par lavage, volume équivalent de solution physiologique) est mélangé, d'une part, à deux volumes de sérum lapin-bœuf 56° ; d'autre part, à deux volumes de sérum de lapin neuf 56°. Après un contact suffisant, on remplit les tubes d'eau physiologique, on centrifuge et décante. On ajoute aux deux sédiments de globules un volume d'eau physiologique. On obtient ainsi des émulsions assez épaisses d'hématies qui ont ou n'ont pas subi la sensibilisation. On prépare ensuite :

1. On peut répéter ce lavage à plusieurs reprises.
2. Ces *Annales*, mai 1900.

Tube *a*. On y verse : 3/10 de centimètre cube de sang sensibilisé et 1,2 c. c. de sérum de cobaye neuf 56°.

Tube *b*. Identique au précédent, sauf que le sérum de cobaye neuf est remplacé par une dose égale de l'antisérum cobaye-lapin 56°.

Tubes *c* et *d*. Respectivement identiques aux précédents, sauf que le sang sensibilisé est remplacé par du sang non sensibilisé.

Une heure après, on ajoute aux quatre tubes 1/10 de centimètre cube d'alexine (sérum très frais de cobaye neuf). En deux ou trois minutes, l'hémolyse s'effectue dans le tube *a ;* elle n'apparaît pas dans les autres. On agite de temps à autre, et au bout d'environ cinq heures, on centrifuge. On reporte dans de nouveaux tubes les liquides limpides décantés, et l'on ajoute à chacun d'eux 4/10 de centimètre cube d'un mélange composé d'une partie de sang de bœuf lavé et de deux parties de sérum lapin-bœuf 56° [1].

Ces nouveaux globules sensibilisés s'hémolysent rapidement (en quelques minutes) sauf dans le liquide provenant du tube *a*, où ils restent intacts [2]. Il résulte de l'expérience que *l'antisérum enlève aux globules sensibilisés le pouvoir de fixer l'alexine ;* ceux-ci se comportent désormais, à ce point de vue, comme des globules normaux.

E.) L'antisensibilisatrice chasse-t-elle, par une sorte de lavage, la sensibilisatrice hors du globule, ou bien *se soude-t-elle à la sensibilisatrice fixée elle-même* sur le globule?

Nous avons vu plus haut que si l'on introduit dans de l'antisérum un volume suffisant de globules sensibilisés, le liquide devient inactif. Mais on pourrait supposer que l'antisensibilisatrice expulse du globule la sensibilisatrice, et que si l'antisérum se montre désormais inerte, c'est qu'il contient les deux substances antagonistes à l'état de saturation mutuelle.

Prenons 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé de bœuf (préparé comme il a été dit dans la première expérience). Ajoutons 3/10 de centimètre cube d'antisérum. Après quelque

1. Le sérum sensibilisateur, étant introduit ainsi en quantité assez considérable, ne saurait être neutralisé dans le tube provenant de *b*, même si l'antisensibilisatrice de celui-ci n'avait pas été entièrement consommée.

2. Il suffit, bien entendu, d'ajouter ultérieurement à ce liquide un peu d'alexine pour que l'hémolyse y apparaisse.

temps de contact, lavons soigneusement à la solution physiologique. Après centrifugation et décantation, délayons le sédiment de globules dans 3/10 de centimètre cube de sérum de cobaye neuf 56°, et ajoutons l'alexine (1/10 de centimètre cube); l'hémolyse n'apparaît pas. La sensibilisatrice dont les hématies s'étaient chargées a-t-elle été chassée par l'antisérum et éliminée ensuite grâce au lavage? Pour le savoir, ajoutons au mélange 1/10 de centimètre cube de sérum de lapin neuf 56° [1]. Nous constatons que cette addition provoque bientôt (parfois en quelques minutes) l'hémolyse, qui sans cette nouvelle intervention ne se serait jamais opérée. Et cependant, des essais complémentaires établissent que ce sérum de lapin neuf est totalement incapable de sensibiliser par lui-même les hématies de bœuf à l'action de l'alexine. Il faut donc bien admettre que la *sensibilisatrice s'est maintenue sur le globule*, que l'antisensibilisatrice s'est fixée sur elle, mais ne l'a point chassée, et que le *sérum de lapin neuf contient un principe* (sensibilisatrice normale ?) *susceptible de décomposer* la combinaison de la sensibilisatrice spécifique avec l'antisensibilisatrice, en déplaçant la première substance pour s'emparer de la seconde. Et si le sérum de lapin neuf, dans ces conditions, sensibilise, il ne le fait qu'indirectement, en faisant réapparaître la sensibilisatrice spécifique précédemment neutralisée.

Nous reviendrons sur cette expérience à propos d'autres questions, notamment à propos de la multiplicité des substances actives dans un même immunsérum. Notons toutefois dès à présent que ce phénomène, que l'on pourrait qualifier de *suppression, par le sérum de lapin neuf 56°, de la guérison des globules réalisée par l'antisérum,* s'effectue avec une rapidité qui varie un peu suivant les conditions de l'expérience. Nous avons remarqué que la réapparition de la sensibilisation sous l'influence d'une addition de sérum de lapin neuf 56° (au mélange globules sensibilisés-antisérum-alexine) s'opère plus difficilement et plus lentement si le contact des hématies et de l'antisérum, avant l'introduction du sérum de lapin neuf, a été prolongé pendant plusieurs heures, que si ce contact a duré moins longtemps. Il semble, en d'autres

1. Rappelons que notre antisérum a été obtenu par injection à des cobayes de sérum de lapin neuf.

termes (à vrai dire, nous nous réservons de faire bientôt à ce sujet des expériences plus complètes), que la combinaison antisensibilisatrice-sensibilisatrice spécifique se consolide en quelque sorte par le temps, et devienne ainsi moins apte à se laisser toucher par les sensibilisatrices normales du sérum de lapin neuf. D'autre part, la combinaison paraît aussi plus stable, plus solide (et moins attaquable par ce dernier sérum employé même à forte dose), si l'antisérum est très puissant.

Que le sérum de lapin neuf contienne des substances douées d'affinité pour l'antisensibilisatrice, le fait n'a rien de surprenant. Nous avons fait voir en 1899 qu'on peut déceler, dans un *sérum neuf, des matières fort comparables aux sensibilisatrices*[1], et MM. Ehrlich et Morgenroth ont fait connaître de nombreux exemples analogues. Aussi est-il (en présence de ces raisons et surtout de l'expérience que nous venons de relater) presque superflu de dire que si l'on ajoute tout d'abord du sérum de lapin 56° à de l'antisérum, celui-ci perd le pouvoir de protéger des globules sensibilisés contre l'influence de l'alexine. Cela va de soi, puisque dans le cas même où les globules ont été déjà guéris par l'antisérum, l'addition de sérum de lapin neuf peut supprimer la protection que l'antisérum avait accordée.

Un autre fait, qui résulte encore de l'évidence de ce qui précède, c'est que des globules sensibilisés de bœuf, guéris par l'antisérum, puis lavés, et qui résistent si bien à l'alexine de cobaye ou d'homme, se détruisent quand on les transporte dans l'alexine de lapin, le sérum de cet animal rétablissant la sensibilisation.

Le pouvoir de faire disparaître la guérison des globules opérée par l'antisérum se retrouve-t-il dans le sérum de lapin neuf, chauffé à des températures dépassant notablement 56°? Oui, si le sérum a été chauffé à 70° pendant une demi-heure. Non, si l'on éprouve le liquide exprimé d'un caillot de sérum coagulé à 100°. D'autre part, ce pouvoir ne se retrouve pas ou n'est que faiblement développé dans l'humeur aqueuse de lapin

1. Elles appartiennent à la même catégorie de substances, mais elles semblent (sauf dans certains cas assez exceptionnels) fort inférieures aux sensibilisatrices spécifiques au point de vue de l'énergie des affinités qu'elles manifestent à l'égard des éléments sensibles. Au surplus, elles sont mal connues et ce n'est qu'avec certaines réserves qu'il convient de leur donner ce nom de sensibilisatrices normales.

neuf (chauffée à 56°). S'il est dû, ce qui est bien vraisemblable, à des sensibilisatrices normales, celles-ci n'existent pas dans ce liquide, ou y sont très rares. Ce fait est en parfaite harmonie avec les résultats expérimentaux que nous avons communiqués en 1895, dans le mémoire (ces *Annales*) où nous avons pu démontrer que le pouvoir bactéricide du choleraserum est dû à la collaboration de deux substances bien distinctes, l'une spécifique, résistant à la chaleur, propre au sérum des vaccinés (matière préventive ou sensibilisatrice) ; l'autre, l'alexine ou matière bactéricide proprement dite, destructible à 55°, non spécifique, répandue en quantité approximativement égale dans le sérum des neufs et dans celui des vaccinés, — la première de ces substances préparant le microbe à l'action de la seconde. L'expérience déjà ancienne dont il s'agit consistait à mélanger de l'humeur aqueuse (chauffée à 56°) d'animal immunisé contre le vibrion cholérique, du sérum frais d'animal neuf quelconque et des vibrions; la bactériolyse ne se produisait pas tandis qu'elle s'opérait énergiquement si le mélange contenait, au lieu d'humeur aqueuse, du sérum (chauffé à 56°) provenant du même animal. L'humeur aqueuse est donc dépourvue de sensibilisatrice.

F.) Lorsqu'on observe qu'un même antisérum, celui que nous étudions par exemple, neutralise plusieurs sensibilisatrices spécifiques provenant d'animaux qui, bien entendu, appartiennent à la même espèce, mais qui ont été immunisés contre des éléments microbiens ou cellulaires différents, doit-on conclure que cet antisérum contient plusieurs antisensibilisatrices également différentes, respectivement combinables à chacune des diverses sensibilisatrices considérées? Ou bien faut-il admettre que *l'antisérum ne renferme qu'une seule antisensibilisatrice, capable de neutraliser*, sans préférence spéciale, *ces sensibilisatrices différentes?*

A vrai dire, cette question, sans avoir fait l'objet de recherches expérimentales directes, semble avoir reçu déjà, de la part de MM. Wassermann[1] et Ford[2], une réponse assez nette, à propos d'un autre problème. Ces savants se sont proposé d'élucider le point suivant : Dans bien des cas, on le sait, le

1. *Zeitschrift für Hygiene*, t. XLII, p. 267, 1903.
2. *Idem*, t. XL, p. 363, 1902.

sérum d'un animal neuf possède, avant toute vaccination, un pouvoir agglutinant[1] bien constatable, s'exerçant par exemple envers un globule d'espèce A. Mais si l'on immunise cet animal contre le globule A, l'agglutinine spécifique, qui se développe bientôt avec activité, doit-elle être considérée comme identique à celle que l'on trouvait déjà, avant le traitement, dans le sérum normal? Bref, l'immunisation se borne-t-elle simplement à exagérer beaucoup la production d'un principe qui préexistait (au moins à faible dose), sans créer à proprement parler de substances nouvelles et particulières? S'il en était ainsi, l'immunisation ne se signalerait que par une modification purement quantitative.

Or, MM. Wassermann et Ford ont pensé que le fait (observé par M. Ford) que nous avons rappelé plus haut, suffit à éclaircir ce point obscur et démontre avec une parfaite évidence l'identité des anticorps actifs sur le même élément, mais qui se rencontrent respectivement dans le sérum des animaux neufs et dans celui des vaccinés contre cet élément. Le fait, répétons-le, c'est que des poules vaccinées contre le sérum de lapin neuf donnent un antisérum neutralisant l'influence agglutinante qu'exercent sur les hématies de poule, d'une part, le sérum de lapin neuf; d'autre part, celui de lapins immunisés contre ces mêmes globules. Et la conclusion est la suivante : si l'antisérum obtenu grâce à l'injection de l'agglutinine normale neutralise aussi l'immunagglutinine, c'est que la seconde agglutinine est identique à la première.

A vrai dire, nous ne concevons point pourquoi MM. Wassermann et Ford considèrent ce raisonnement comme fondé. Il ne serait valable que si l'on avait acquis, au préalable, la certitude qu'une antiagglutinine (ou antisensibilisatrice) unique ne peut, en aucun cas, neutraliser plusieurs agglutinines (ou sensibilisatrices) différentes. Mais MM. Wasserman et Ford n'ont rien démontré de pareil. Pourquoi, dès lors, si nous formulions tout d'abord l'hypothèse contraire, — à savoir qu'une seule et même antiagglutinine (ou antisensibilisatrice) paralyse indifférem-

1. Il s'agit, il est vrai, dans l'exemple de MM. Wassermann et Ford, non de sensibilisatrices, mais d'agglutinines. Mais ce n'est pas dépasser les bornes de la vraisemblance que d'appliquer aux sensibilisatrices des résultats obtenus à propos d'agglutinines, et d'étendre par conséquent aux antisensibilisatrices des conclusions relatives aux antiagglutinines.

ment, sans manifester de spécificité stricte, toutes les agglutinines (ou sensibilisatrices) diverses qu'une même espèce animale est susceptible d'élaborer, — pourquoi ne pourrions-nous pas admettre que les deux agglutinines en question, actives sur le globule de poule (celle du sérum de lapin neuf, celle de l'immunsérum), ne sont pas complètement identiques, présentent entre elles certaines différences comparables, par exemple (ceci n'est qu'une comparaison), à celles qui séparent l'une de l'autre deux immunagglutinines provenant de la même espèce, mais impressionnant des globules différents? Pourquoi en effet devrions-nous accepter sans contrôle cette thèse, que MM. Wassermann et Ford semblent considérer comme un axiome, qu'à chaque substance active correspond régulièrement un anticorps spécifique, strictement et exclusivement approprié, ou que, ce qui revient au même, l'identité de deux substances résulte nécessairement du fait qu'elles sont neutralisées par le même anticorps? Pourquoi serions-nous finalement, en raison de l'expérience de M. Ford, forcés d'accueillir cette notion que l'immunisation se borne à augmenter dans l'organisme la dose d'une matière active, sans la changer en rien au point de vue qualitatif? On le voit, il est indispensable, avant d'admettre la conclusion de MM. Wassermann et Ford (dont l'importance relativement à la genèse des matières actives des immunsérums est évidente) de traiter tout d'abord la question F posée plus haut. Or (les expériences qui suivent le démontrent) une même antisensibilisatrice peut neutraliser des sensibilisatrices qui sont différentes, qui le sont même nettement, car elles impressionnent des éléments différents.

Quand on mélange à notre antisérum des globules de bœuf chargés (par absorption spécifique suivie de lavage) de sensibilisatrice lapin-bœuf, l'antisensibilisatrice, nous le savons, se consomme en guérissant les hématies sensibilisées, de telle sorte que le liquide surnageant, décanté après centrifugation, ne protège plus de nouveaux globules sensibilisés. Mais ce liquide ne protègera-t-il pas davantage des globules différents des premiers, chargés d'une autre sensibilisatrice, par exemple des globules de poule traités par du sérum lapin-poule? L'expérience, dont le détail suit, répond négativement. La même antisensibilisatrice neutralise donc deux sensibilisatrices différentes (lapin-bœuf et lapin-poule). On démontre en même temps, bien entendu,

d'abord que des globules de bœuf traités par la sensibilisatrice lapin-poule (qu'ils ne fixent pas) ne font pas disparaître, dans l'antisérum, le pouvoir de protéger ultérieurement des hématies sensibilisées de poule ou de bœuf; — ensuite, que le sérum lapin-bœuf n'est pas sensibilisateur à l'égard des globules de poule.

Du sang de bœuf préalablement lavé (et dont la richesse en globules est sensiblement égale à celle du sang défibriné primitif) est réparti dans 2 larges tubes, à dose de 1, 5 centimètre cube, et additionné de deux volumes (3 c. c.) soit de sérum lapin-bœuf 56°, soit de sérum lapin-poule 56°. On lave (remplissage des tubes par l'eau physiologique, centrifugation décantation), et l'on ajoute aux sédiments de globules 1, 5 centimètre cube d'eau physiologique. L'un des sangs obtenus est donc sensibilisé, l'autre ne l'est pas.

De même, on prépare du sang de poule sensibilisé ou non, en suivant une technique identique, en soumettant donc les hématies à l'action soit de sérum lapin-poule 56°, soit de sérum lapin-bœuf 56°.

D'autre part, on dilue, pour diminuer son activité et le rendre ainsi plus maniable, de l'antisérum dans volume égal de sérum de cobaye neuf 56°. Appelons ce mélange antisérum dilué[1]. Préparons alors les mélanges suivants, dans lesquels l'antisérum se trouve en présence de fortes doses des 2 sangs de bœuf que nous venons d'obtenir :

Tube A. On y met 1 c. c. de sang de bœuf sensibilisé, et 2,5 c. c., d'antisérum dilué.

Tube B. Identique au précédent, sauf que le sang n'est pas sensibilisé (c'est celui qui a été traité par le sérum lapin-poule).

Au bout d'une heure, on centrifuge et on décante les liquides surnageants A et B, dont le premier, nous pouvons le prévoir, est dépouillé d'antisensibilisatrice. Ils servent à la confection des mélanges suivants :

Tubes C et D. Tous deux reçoivent 1 c. c. de liquide A; on ajoute, en outre, à C une petite quantité (1/10 de centimètre

1. Disons en passant que 4 parties de cet antisérum protègent complètement, contre l'addition ultérieure d'alexine, une partie environ du sang sensibilisé employé dans l'expérience. Dans le tube de contrôle où l'antisérum est remplacé par du sérum de cobaye neuf 56°, l'hémolyse n'exige que 5 minutes.

cube) de sang de bœuf sensibilisé, à D la même dose de sang de poule sensibilisé.

Tubes E et F. Même composition respectivement que les tubes C et D, sauf qu'au lieu d'y mettre du liquide A, on y verse du liquide B.

On prépare encore des mélanges témoins, contenant 1 c. c. de sérum de cobaye neuf 56°, et 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé de poule ou de bœuf, ou bien encore offrant la même composition, sauf que les globules ne sont pas sensibilisés. Ce sont les témoins sans antisérum.

On attend environ 3/4 d'heure, puis on ajoute aux tubes C,D,E,F, et aux témoins, 2/10 de centimètre cube d'alexine (sérum frais de cobaye neuf).

On constate qu'aucune hémolyse, soit des globules de bœuf, soit des globules de poule, ne survient dans les tubes E et F, qui contiennent du liquide B, c'est-à-dire de l'antisérum qui (n'ayant été en contact antérieurement qu'avec des globules de bœuf non sensibilisés) n'a pas été privé de son pouvoir antisensibilisateur. Pas d'hémolyse non plus, cela va de soi, dans les témoins sans antisérum contenant des globules non sensibilisés. Au contraire, dans les tubes C et D, renfermant le liquide A (dont l'antisensibilisatrice a été au préalable consommée par les globules de bœuf sensibilisés), l'hémolyse des globules de poule ou de bœuf s'effectue très vite, tout aussi rapidement que dans les témoins sans antisérum, contenant des globules sensibilisés identiques. La même antisensibilisatrice neutralise donc les deux sensibilisatrices employées, lesquelles sont nettement différentes, puisque l'une, spécifiquement appropriée aux globules de bœuf, est combinable à ceux-ci, tandis que l'autre ne l'est pas.

Au surplus, cette expérience n'était même pas indispensable, car la conclusion qu'elle comporte se dégage, avec une entière évidence, d'un autre fait, relatif aux propriétés du sérum de lapin neuf. Nous avons vu plus haut que, lorsqu'on ajoute à un mélange de globules sensibilisés, d'antisérum et d'alexine (dans lequel les hématies sont restées intactes, la sensibilisatrice ayant été annihilée) un peu de sérum de lapin neuf 56°, l'hémolyse apparaît; on doit admettre que ce dernier sérum renferme une substance capable de déplacer, au moins partiellement, la sensi-

bilisatrice spécifique en s'emparant de l'antitoxine. Que cette substance ne doive pas être considérée comme étant de la sensibilisatrice lapin-bœuf, qui préexisterait en certaine dose dans le sérum des lapins neufs, cela résulte déjà du fait que ce dernier ne rend nullement les globules de bœuf plus sensibles à l'influence alexique. Mais, pour en être plus sûr, et éliminer toute objection, recherchons si le sérum de lapin neuf se comporte encore de même lorsqu'au préalable on le traite par un grand excès de sang de bœuf.

Versons dans un large tube 1 c. c. de sang défibriné de bœuf; remplissons d'eau physiologique, centrifugeons et aspirons tout le liquide, en ne laissant que le culot de globules, que nous délayons ensuite dans 1 c. c. de sérum de lapin neuf 56°. Le lendemain, centrifugeons cette émulsion, séparons le sérum surnageant et versons-le sur un nouveau sédiment de globules préparé comme le précédent aux dépens de 1 c. c. de sang de bœuf. On peut espérer qu'à la faveur de ces deux contacts successifs, les globules auront absorbé, dans le sérum neuf, ce qui leur est combinable. D'autre part, on se procure du sang de bœuf sensibilisé et lavé (semblable à celui de la 1re expérience).

A deux tubes A et B contenant tous deux 1/10 de centimètre cube de sang sensibilisé lavé et 3/10 de centimètre cube d'antisérum, on ajoute tout d'abord 1/10 de centimètre cube d'alexine de cobaye; on additionne ensuite le tube A de 2/10 de centimètre cube de sérum de lapin neuf traité comme il a été dit. Les globules s'hémolysent en une dizaine de minutes dans le tube A. Ils restent intacts dans le tube B. Un témoin montre que l'introduction du sérum neuf ne produit aucune hémolyse dans un mélange en mêmes proportions de globules non sensibilisés, d'antisérum et d'alexine.

On peut réaliser une expérience identique en se servant, au lieu de sérum de lapin neuf, de sérum de lapin-bœuf préalablement dépourvu (ainsi que le montrent des mélanges témoins) de toute activité spécifique grâce à deux contacts successifs avec des globules de bœuf. Le résultat est le même que pour le sérum de lapin neuf. Le sérum de lapin-bœuf se combine donc encore avec l'antisensibilisatrice, même s'il a été entièrement dépouillé de tout pouvoir sensibilisateur spécifique à l'égard des globules de bœuf; si, en d'autres termes, il ne contient plus que des

sensibilisatrices normales [1] n'ayant pas d'affinité spéciale pour ces hématies.

On ne peut donc pas, comme le font MM. Wassermann et Ford, admettre sans autres preuves que deux sensibilisatrices (ou agglutinines) sont identiques parce qu'elles sont neutralisées par le même anticorps. La *conclusion de ces savants relative à l'identité des agglutinines*, actives sur le même globule, mais dont *l'une existe déjà chez les neufs* tandis que *l'autre est obtenue par immunisation*, ne découle pas de leurs expériences. Elle est peut-être exacte, mais rien jusqu'ici n'en démontre le bien-fondé.

La réponse à la question F est donc *qu'une seule et même antisensibilisatrice peut neutraliser plusieurs sensibilisatrices* provenant de la même espèce animale, mais agissant spécifiquement *sur des éléments différents*. Si, d'autre part, on tient compte de ce fait, noté déjà par plusieurs observateurs (Ehrlich et Morgenroth, Pfeiffer et Friedberger), qu'un antisérum obtenu par injection à un animal A d'un sérum d'espèce B n'agit pas sur (ou n'impressionne que rarement et faiblement) les sensibilisatrices fournies par des espèces C ou D, la conclusion doit être qu'*au point de vue de l'influence de l'antisensibilisatrice, il y a plus de parenté entre des sensibilisatrices de provenance commune, mais actives à l'égard d'éléments différents, qu'entre des sensibilisatrices actives sur le même élément, mais qui ont été élaborées par des organismes divers.*

II

OBSERVATIONS CONCERNANT LES THÉORIES CHIMIQUES DE L'IMMUNITÉ.

L'étude des antisensibilisatrices suggère diverses remarques sur lesquelles nous croyons devoir attirer l'attention ; elles nous paraissent en effet susceptibles de faciliter la compréhension de certains faits insuffisamment expliqués ou qui ont été l'objet d'interprétations parfois inexactes ou prématurées. Nous émet-

1. Insistons encore sur ce fait que, lorsque nous donnons à ces substances du sérum neuf le nom de sensibilisatrices normales, cette désignation assez conventionnelle signifie simplement que ces matières peuvent, comme les sensibilisatrices spécifiques, se combiner à l'antisensibilisatrice. Mais nous ne savons pas grand'chose relativement à leur nature et à leurs autres propriétés. Et si nous leur donnons un nom précis, c'est plutôt pour faciliter le langage.

trons donc quelques observations relatives, d'abord à la théorie d'Ehrlich, ensuite au mécanisme de l'immunité passive.

Il est un troisième point toutefois qu'il serait utile également de considérer de plus près : c'est la question du mode d'action des antitoxines sur les toxines, pour laquelle l'étude des anti-sensibilisatrices semble devoir apporter des renseignements intéressants. En effet, grâce à cette propriété que les globules possèdent d'extraire électivement, du sérum hémolytique 56° la sensibilisatrice spécifique qui leur est appropriée, on peut facilement, nous l'avons vu, épurer la solution toxique, isoler en d'autres termes la seule toxine que l'on désire soumettre à l'influence antitoxique. D'autre part, le fait que les sensibilisatrices normales du sérum de lapin neuf (non toxiques pour les globules, mais douées néanmoins pour l'antitoxine d'une affinité très comparable à celle que manifeste la toxine véritable ou sensibilisatrice spécifique), ajoutées à la toxine déjà neutralisée (globules sensibilisés + antisérum), font réapparaître celle-ci en s'emparant d'une certaine dose d'antitoxine, permettra, on peut l'espérer, de déterminer suivant quelle loi s'établit l'équilibre entre les substances antagonistes. Mais nos recherches à ce sujet n'étant pas terminées, nous ne discuterons point, dans le présent mémoire, les théories qui concernent la réaction des antitoxines sur les toxines. Nous nous bornerons pour le moment à signaler un fait tendant à faire admettre que l'annihilation d'une toxine par une antitoxine est rarement absolue, — soit que la réaction ne s'opère jamais complètement, le mélange contenant toujours des traces de toxine libre (Arrhenius et Madsen), soit que, comme nous l'avons supposé, la neutralisation d'une toxine par une antitoxine n'est en réalité qu'une atténuation, qui peut être plus ou moins prononcée, suivant que la toxine a fixé plus ou moins d'antitoxine. D'après notre hypothèse en effet, les deux substances s'unissent en proportions variables, peuvent donc fournir, entre ces deux termes extrêmes, toxine libre, toxine entièrement saturée, toute une série de composés intermédiaires dont la richesse en l'une ou l'autre matière dépend des proportions relatives employées pour constituer le mélange, et dont la toxicité baisse (sans devoir nécessairement se réduire à zéro) au fur et à mesure qu'ils renferment plus d'antitoxine. On le sait, les toxones d'Ehrlich (dont on constate

l'apparition lorsqu'on mélange à de la toxine une dose d'antitoxine qui ne suffit pas à réaliser la neutralisation complète) représentent simplement, pour Arrhenius et Madsen, une petite quantité de toxine libre ; pour nous, elles consistent en molécules toxiques insuffisamment saturées d'antitoxine et dont corrélativement la toxicité n'est qu'affaiblie sans être détruite. Or, il semble bien que nous assistions, lorsque nous mélangeons l'antisérum et la sensibilisatrice, à la formation de toxones dérivant réellement de la toxine elle-même, en ce sens que sous l'influence de l'antisérum, la sensibilisatrice ne subit qu'une diminution et non une abolition complète de son énergie primitive. La sensibilisation, nous le savons, est très affaiblie, et c'est pourquoi les globules restent intacts dans les conditions ordinaires des expériences, c'est-à-dire quand ils baignent dans un milieu de composition convenablement appropriée (sérum). Mais elle n'est pas, comme on va le voir, totalement annulée, car elle se trahit encore lorsque les globules sont rendus plus vulnérables par le séjour dans un liquide moins favorable à leur conservation (solution physiologique), lorsque, en d'autres termes, les conditions de milieu sont de nature à faciliter la manifestation du pouvoir sensibilisateur. En pareil cas, la protection accordée par l'antisérum est inefficace; elle est impuissante à empêcher l'hémolyse.

Ajoutons à 2/10 de centimètre cube de sang de bœuf sensibilisé (en émulsion assez diluée dans l'eau physiologique), de l'antisérum en dose (6/10 de centimètre cube) notablement supérieure à celle qui suffit habituellement à protéger les hématies. Remplissons ensuite d'eau physiologique, centrifugeons et décantons tout le liquide. Au sédiment de globules, ajoutons 6/10 de centimètre cube de sérum de cobaye neuf 56°, puis 2/10 de centimètre cube d'alexine de cobaye. Dans ces conditions, nous le savons, les globules sont encore intacts le lendemain. Réalisons d'autre part la même expérience, avec cette variante qu'après le lavage, nous ajoutons au sédiment, au lieu de 6/10 de centimètre cube de sérum de cobaye neuf 56°, 6/10 de centimètre cube de solution physiologique de NaCl (à 7,5 ou même 9 0/00) ; introduisons ensuite 2/10 de centimètre cube d'alexine. Nous constatons que l'hémolyse s'effectue avec une certaine lenteur, il est vrai, mais est complète au

bout d'une heure environ[1]. La guérison des globules n'était donc que relative; la sensibilisation, simplement atténuée, produit encore ses effets si les globules sont maintenus dans un milieu défectueux diminuant leur résistance[2].

Ne peut-on pas comparer ce fait avec celui que MM. Roux et Vaillard ont observé il y a longtemps déjà, et d'après lequel un mélange de toxine et d'antitoxine tétaniques, inoffensif pour des cobayes normaux, était dangereux pour des cobayes débilités antérieurement par la vaccination contre le vibrion cholérique ?

Sans insister davantage, pour le moment, sur ces questions, revenons au sujet proprement dit du présent chapitre.

Théorie d'Ehrlich. — Relative à l'origine des anticorps, elle consiste, on le sait, en ceci : quand on injecte à un animal une substance dont l'inoculation est susceptible de déterminer la production d'un anticorps, cette substance se soude à certains éléments chimiques (récepteurs) appartenant à des cellules déterminées. Celles-ci, troublées, réagissent. Pour rétablir l'intégrité constante de leur constitution, elles élaborent de nouveaux récepteurs, lesquels, reproduits en abondance exagérée (la réaction étant trop intense), quittent la cellule et se déversent dans les humeurs, où ils constituent l'anticorps caractérisant le sérum obtenu.

La théorie fournit donc une recette commode pour découvrir la nature des anticorps. Appliquons-la à l'antisensibilisatrice qui, dans nos expériences, neutralise notamment la sensibilisatrice lapin-bœuf. Quand on immunise des cobayes contre le sérum de lapin neuf, il faut supposer, d'après la théorie, que les cobayes possèdent des récepteurs capables (comme ceux qu'on trouve dans les globules de bœuf) de se combiner à certains principes actifs (sensibilisatrices normales) du sérum neuf de lapin. Les récepteurs, atteints par l'injection, sont ultérieurement, grâce à la réaction cellulaire, reproduits avec activité, et l'excès se répand dans le sérum auquel il confère la propriété de

1. On s'assure de ce que des globules traités de la même manière, mais non sensibilisés, ne s'altèrent pas. On sait d'autre part que le sérum de cobaye neuf 56° n'est pas antisensibilisateur.

2. Que l'eau physiologique rende les globules peu résistants à l'action de traces de sérum hémolytique, c'est un fait couramment observé par les expérimentateurs.

neutraliser la sensibilisatrice spécifique lapin-bœuf. En conséquence, l'antisensibilisatrice est constituée de récepteurs identiques ou très analogues à ceux qui dans le globule de bœuf se combinent à la sensibilisatrice[1]. Elle doit donc se comporter comme ces derniers, puisqu'elle n'est, si l'on peut s'exprimer ainsi, qu'une solution dans le sérum de semblables récepteurs. Cette constitution de l'antisensibilisatrice est au surplus bien celle que M. Morgenroth a récemment acceptée.

Or, l'inexactitude de cette conception, issue de la théorie d'Ehrlich, ressort à l'évidence des faits que nous avons signalés dans le présent article. Tout d'abord, si l'antisensibilisatrice était identique aux récepteurs de globules (de bœuf par exemple) intervenant dans les expériences, elle ne se combinerait pas à la sensibilisatrice déjà saturée de ces récepteurs, c'est-à-dire déjà fixée sur les globules. Et la guérison, par l'antisérum, des globules sensibilisés, serait impossible.

D'autre part, si l'antisensibilisatrice était identique aux récepteurs dont il s'agit, il est clair que toute substance capable de se combiner à elle s'unirait aussi, de la même façon, aux globules de bœuf. Or, le sérum neuf de lapin contient des matières qui ne sont point combinables aux récepteurs des globules de bœuf (en effet, ceux-ci n'en dépouillent aucunement le liquide) et qui pourtant sont tellement avides d'antisensibilisatrice qu'elles peuvent la disputer avec succès à la sensibilisatrice lapin-bœuf. De même, le sérum lapin-bœuf, complètement dépouillé au préalable de sa sensibilisatrice spécifique à l'égard des globules de bœuf, sature encore l'antisensibilisatrice. Bien plus, que la même antisensibilisatrice sature indifféremment diverses sensibilisatrices, dont l'une est combinable aux globules de bœuf, tandis que les autres ne le sont pas, c'est ce qui résulte encore de l'expérience où nous montrons que l'antisérum, traité par des globules de bœuf chargés de leur sensibilisatrice appropriée, ne protège plus désormais d'autres globules d'espèce différente, impressionnés par une sensibilisatrice différente de la première.

La théorie que nous discutons est encore en opposition directe avec le fait que l'antisérum enlève aux globules sensibi-

1. Selon la terminologie de M. Ehrlich, tous ces récepteurs doivent avoir le même groupement haptophore.

lisés le pouvoir d'absorber l'alexine. Il est clair que si l'antisensibilisatrice était formée de récepteurs de globules, sa combinaison avec la sensibilisatrice devrait, au même titre que celle de cette dernière substance avec le globule, s'emparer énergiquement de l'alexine présente. Et c'est le contraire qu'on observe[1].

En résumé, les faits suivants : 1° l'antisensibilisatrice s'unit à la sensibilisatrice déjà fixée sur les globules appropriés et guérit ainsi ces derniers ; 2° l'antisérum doit son activité à une seule et même susbtance, conférant à cet antisérum le pouvoir de protéger des éléments sensibilisés différents, c'est-à-dire de neutraliser des sensibilisatrices différentes et qui en conséquence sont respectivement combinables à des récepteurs différents ; par exemple, la même antisensibilisatrice se combine non seulement à la sensibilisatrice lapin-bœuf, mais aussi à d'autres sensibilisatrices (normales ou spécifiques) incapables de s'unir aux hématies de bœuf ; 3° l'antisérum enlève aux globules sensibilisés le pouvoir d'absorber l'alexine, — ces divers faits nous paraissent formellement inconciliables avec la théorie d'Ehrlich, et contribuent à démontrer qu'en thèse générale, *les antitoxines* (ou autres anticorps) *ne sauraient être assimilées aux récepteurs qui fixent les poisons*. Nous les considérons toutes (qu'elles agissent contre les poisons microbiens, végétaux ou animaux) comme *des substances de même ordre, d'origine cellulaire commune*, appartenant à la même catégorie de matières, offrant les unes avec les autres des liens étroits de parenté. Et si la théorie des récepteurs était vraie, *aucune analogie* n'unirait entre elles les diverses antitoxines, car — on peut raisonnablement l'admettre, semble-t-il, — les récepteurs atteints par les diverses toxines, microbiennes, animales ou végétales, doivent être bien différents suivant la nature et les propriétés de chacun de ces poisons !

MM. Ehrlich et Morgenroth ont consacré à l'étude des antisensibilisatrices la plus grande partie d'un mémoire[2] dont l'importance, pour les partisans de la théorie des chaînes laté-

1. Si nous pouvions accepter les notions défendues par M. Ehrlich et son école (notamment que la sensibilisatrice se combine avec l'alexine et que d'autre part chacune des propriétés qu'une substance peut manifester est représentée dans la molécule par un groupement particulier), nous dirions que l'antisensibilisatrice ne devrait s'unir qu'au groupement cytophile de la sensibilisatrice et non pas à son groupement complémentophile. C'est ce que l'expérience dément.

2. Ueber Haemolyse VI Mittheilung. *Berliner Klin. Wochenschrift*, 1901, n°s 21-22.

rales, est essentielle. Cet article, en effet, est l'un de ceux qui ont le plus contribué à propager cette conception et qui ont paru fournir, en sa faveur, les arguments les plus convaincants. Les données qu'il renferme sont d'ailleurs en opposition formelle avec les nôtres et nous devons les discuter. Mais nous envisagerons tout d'abord un travail récemment publié par M. Morgenroth[1].

On connaît l'hypothèse de la « déviation du complément » (Komplementablenkung), formulée à propos des constatations de MM. Neisser et Wechsberg relativement à l'influence empêchante qu'exerce, sur le phénomène de la bactériolyse (lorsque la dose d'alexine ajoutée aux microbes est assez faible), l'intervention d'une quantité trop forte de sensibilisatrice. Il a été admis — sans démonstration directe, — que, les microbes ne pouvant absorber entièrement la forte dose de sensibilisatrice mise en jeu, l'excès de cette matière qui persiste dans le liquide s'unit à l'alexine, en accapare ainsi une part plus ou moins importante, laquelle ne peut dès lors atteindre les microbes. Mais, chose assez singulière, ce rôle empêchant d'un excès de sensibilisatrice n'avait pu être constaté dans les expériences d'hémolyse, et M. Morgenroth s'est efforcé de combler cette lacune fâcheuse pour la théorie. Il admet tout d'abord que les sensibilisatrices hémotoxiques ont besoin, pour manifester beaucoup d'affinité à l'égard de l'alexine, de s'être au préalable combinées aux récepteurs des globules appropriés[2]. Par conséquent, dans un mélange de globules, d'alexine et d'une dose trop forte de sensibilisatrice, l'excès de cette dernière substance, qui reste à l'état libre dans le liquide, ne peut s'emparer d'aucune portion d'alexine, car il exige, pour se montrer avide de complément, qu'on mette à sa disposition des récepteurs de globules. L'introduction de ceux-ci est nécessaire pour que la déviation du complément (alexine) se manifeste. Or, partant de cette idée (conforme à la théorie des chaînes latérales) que l'antisensibilisa-

1. Komplementablenkung durch hämolytische Ambozeptoren. *Centralblatt für Bakteriologie*. Orig., t. xxxv, p. 501, 1904.

2. On peut se demander pourquoi les sensibilisatrices antimicrobiennes ne ressentent pas, au même degré, le même besoin. Il est certain que si l'expérience avait montré l'inverse, c'est-à-dire que le phénomène de la déviation du complément se constate pour l'hémolyse et non pour la bactériolyse, l'explication n'en aurait pas souffert : il eût suffi de la retourner.

trice est identique aux récepteurs de globules au point de vue de ses affinités (possède un groupement haptophore identique à celui des globules), M. Morgenroth a prévu qu'un mélange de sensibilisatrice et d'antisensibilisatrice devait pouvoir fixer une certaine quantité d'alexine, devait en d'autres termes se comporter exactement comme un mélange de sensibilisatrice et de globules, lequel, ainsi que nous l'avons montré[1], absorbe l'alexine avec beaucoup d'énergie. Il est clair que si l'on identifie ces deux éléments : récepteurs de globules, antisensibilisatrice, l'introduction, soit de l'un, soit de l'autre, dans un mélange de sensibilisatrice et d'alexine, doit provoquer, de la même façon, la consommation (fixation) d'une certaine portion de cette matière active, et diminuer en conséquence la force hémolytique du liquide. Des globules sensibilisés, ultérieurement employés comme réactifs de l'énergie destructive, auront donc moins de chances de s'hémolyser si on les introduit dans un mélange d'alexine, d'antisensibilisatrice et de sensibilisatrice, que si on les plonge dans une mixture contenant en mêmes proportions l'antisensibilisatrice et l'alexine, mais ne renfermant pas de sensibilisatrice. La cause de cette différence réside naturellement en ce que, dans le premier cas, une partie de l'alexine aura été déjà consommée par le complexe « sensibilisatrice-antisensibilisatrice », lequel fonctionne exactement comme le ferait le complexe « sensibilisatrice-globules » puisque, d'après M. Morgenroth, les termes antisensibilisatrice et récepteurs de globules sont synonymes.

Or, l'expérience a confirmé les prévisions de M. Morgenroth. On peut, en mélangeant (suivant des proportions soigneusement calculées) de l'alexine (de cobaye), de la sensibilisatrice (sérum lapin-bœuf 56°), et de l'antisensibilisatrice (sérum, chauffé à 56°, de chèvre qui a reçu des injections de sérum lapin-bœuf) constater que l'alexine ne persiste plus à l'état libre. En effet, si l'on ajoute au bout de quelque temps des globules sensibilisés, d'une part à ce mélange, d'autre part à un mélange identique, sauf qu'il ne contient pas de sensibilisatrice, l'hémolyse peut, si les doses sont convenablement choisies, apparaître dans la seconde mixture, et faire défaut dans la première dont l'alexine semble avoir disparu.

1. Ces *Annales*, mai 1900.

Seulement, M. Morgenroth ne démontre point que les effets observés sont dus bien réellement aux substances qu'il met en cause. Rien ne prouve que la disparition de l'alexine soit due à ce que cette substance s'est combinée à la sensibilisatrice lapin-bœuf soudée elle-même aux récepteurs, c'est-à-dire à l'antisensibilisatrice. Pour démontrer que cette sensibilisatrice commande le phénomène, en d'autres termes accapare dans ces conditions l'alexine, il aurait fallu constater notamment que l'on n'obtient nullement le même résultat expérimental, si on mélange de l'alexine, de l'antisensibilisatrice et de l'immunsérum lapin-bœuf préalablement dépouillé de sa sensibilisatrice spécifique grâce à un contact préalable avec les globules appropriés [1].

Le phénomène observé par M. Morgenroth nous paraît, en effet, justiciable d'une explication toute différente. Outre l'alexine, deux sérums interviennent dans l'expérience. Le premier (antisensibilisatrice) a été obtenu par injection (à des chèvres) du second (sérum de lapins immunisés contre les globules de bœuf). Il est certain que le premier est antisensibilisateur à l'égard du second, en ce sens qu'il peut neutraliser la sensibilisatrice spécifique de ce dernier. Mais il est aussi, à un autre point de vue, sensibilisateur à l'égard de ce second sérum, et c'est ce dont M. Morgenroth ne tient pas compte. En effet, l'antisérum (sérum I) provient d'animaux injectés de sérum d'espèce étrangère (sérum II) et, à ce titre, il doit sensibiliser le sérum II considéré comme solution d'albuminoïdes, exactement comme du sérum d'animaux vaccinés contre du lait sensibilise celui-ci, c'est-à-dire confère à certains constituants du lait le pouvoir d'absorber l'alexine [2]. M. Gengou a mis en évidence ce fait intéressant que l'on peut obtenir des « sensibilisatrices antialbuminoïdes » tout à fait comparables aux sensibilisatrices antimicrobiennes ou antihématiques, et qui, comme ces dernières, provoquent la fixation de l'alexine par l'élément impressionné. M. Gengou a prouvé l'existence de semblables sensibilisatrices non seulement dans le sérum d'animaux immunisés contre du lait, mais encore (et ceci rentre tout à fait dans les conditions expérimentales de M. Morgenroth) dans celui d'organismes

1. Ou bien encore si l'on mélange de l'alexine, de l'antisensibilisatrice et du sérum de lapin neuf.

2. Gengou, Sur les sensibilisatrices des sérums actifs contre les substances albuminoïdes. Ces *Annales*, octobre 1902.

traités par du sérum étranger. On peut donc supposer que l'absorption d'alexine est opérée, non par le complexe résultant de l'union de l'antisensibilisatrice avec la sensibilisatrice spécifique pour les globules de bœuf, mais simplement par certains albuminoïdes sensibilisés appartenant au sérum lapin-bœuf.

La conclusion de M. Morgenroth nous paraît donc, jusqu'à plus ample informé, inacceptable. Pour nous, la théorie de la déviation du complément par l'ambocepteur (sensibilisatrice), est une légende. Quant à l'identité des récepteurs et des anticorps, elle nous paraît, nous l'avons dit, inadmissible. Incompatible avec nos résultats, elle ne rencontre aucune confirmation dans les recherches de MM. Pfeiffer et Friedberger, dont le zèle pour la théorie d'Ehrlich reste d'ailleurs inaltérable.

Signalons en passant ce fait que, dans ses expériences, M. Morgenroth n'a point constaté que son antisensibilisatrice pût guérir des globules déjà sensibilisés. Ce résultat est différent du nôtre; il est vrai que nous n'avons pas employé le même antisérum. Mais on peut se demander si l'emploi exagéré, dans les mélanges, de la solution physiologique (laquelle, nous l'avons vu, nuit beaucoup à la protection des globules et doit autant que possible être écartée des expériences sur l'hémolyse) n'a pas compromis l'exactitude des observations de ce savant.

Considérons maintenant, aussi brièvement que possible, les idées émises par MM. Ehrlich et Morgenroth, à propos des antisensibilisatrices, dans leur sixième mémoire sur l'hémolyse.

Ces savants étudient un immunsérum de lapins immunisés contre le sang de bœuf. Ils observent que ce sérum permet l'hémolyse des globules de bœuf sous l'influence de diverses alexines, celles de cobaye et de chèvre notamment. Seulement, ils constatent que, pour provoquer l'hémolyse, il faut sensibiliser les globules plus fortement (en d'autres termes, il faut les traiter par une dose plus forte d'immunsérum chauffé) lorsqu'on met en jeu l'alexine de chèvre que lorsqu'on fait intervenir l'alexine de cobaye. Ce résultat, à vrai dire, n'a rien de surprenant. On sait bien que les alexines d'animaux différents ne sont pas complètement identiques; il serait dès lors bien étrange qu'étant différentes, elles eussent toutes exactement la même aptitude à détruire une hématie déterminée; il ne faut pas

s'étonner, en conséquence, de voir certaines d'entre elles exiger, pour effectuer l'hémolyse, que les globules soient rendus très attaquables grâce à une sensibilisation fort énergique, d'autres espèces d'alexine détruisant sans peine des globules faiblement impressionnés par la sensibilisatrice. Mais MM. Ehrlich et Morgenroth rejettent cette explication si simple. Ils préfèrent admettre que l'immunsérum contient en réalité deux (ou davantage) sensibilisatrices distinctes x et y; l'une (x), la plus abondante, est très efficace lorsqu'on emploie l'alexine de cobaye, qui lui convient, mais ne trouve pas, dans le sérum de chèvre, de complément (alexine) approprié avec lequel elle puisse s'accorder; cette première sensibilisatrice n'intervient donc pas dans l'hémolyse réalisée par l'alexine de chèvre. Mais d'autre part celle-ci convient très bien à la seconde sensibilisatrice (y) de l'immunsérum; toutefois, cette substance y n'existant qu'à faible dose, n'exerce ses effets que si l'on a soin de faire intervenir une grande quantité d'immunsérum. Voilà pourquoi il faut employer beaucoup d'immunsérum lorsque, pour provoquer l'hémolyse, on se sert d'alexine de chèvre. Acceptons jusqu'à nouvel ordre, sans insister davantage sur son invraisemblance, cette thèse de la multiplicité des sensibilisatrices dans un même immunsérum, et poursuivons.

MM. Ehrlich et Morgenroth ont un second sérum (antisérum), qui peut neutraliser l'immunsérum lapin-bœuf et qui provient de chèvres injectées au préalable de cet immunsérum. Ils ajoutent tout d'abord à une dose assez forte (que nous appellerons dose A) d'antisérum, une petite quantité de sérum lapin-bœuf, et introduisent dans ce mélange des globules de bœuf. Ceux-ci sont ensuite (après lavage) additionnés d'alexine de cobaye. Les globules résistent, ce qui démontre que le pouvoir sensibilisateur a été aboli par l'antisérum. La conclusion est la suivante : L'antisérum est antitoxique à l'égard de la sensibilisatrice x qui convient à l'alexine de cobaye.

MM. Ehrlich et Morgenroth réalisent ensuite une seconde expérience, fort semblable à la première, avec cette différence qu'ils mettent en jeu cette fois l'alexine de chèvre. Dans ces conditions l'antisérum ne paraît nullement protéger les globules : l'hémolyse apparaît. Et voici la conclusion : L'antisensibilisatrice est tellement spécifique que, tout en étant apte à neutraliser la

sensibilisatrice x, elle se montre inactive à l'égard de la sensibilisatrice y, qui convient spécialement à l'alexine de chèvre. Et ce fait contribue à prouver qu'il y a vraiment deux sensibilisatrices distinctes.

Seulement, le second essai diffère du premier par un détail dont il convient de signaler l'importance. Imbus de cette idée que l'immunsérum lapin-bœuf ne contient qu'en dose très faible cette sensibilisatrice particulière y qui s'accommode de l'alexine de chèvre, MM. Ehrlich et Morgenroth jugent indispensable de mélanger à la dose A d'antisérum (dose identique à celle mise en jeu dans la première expérience) une quantité d'immunsérum lapin-bœuf très supérieure à celle que contenait la mixture précédente. Ils s'imaginent que cette technique se justifie pour cette raison qu'un volume même fort grand de sérum lapin-bœuf ne contient qu'une dose très modérée, nullement exagérée, de la sensibilisatrice spéciale y qu'on désire soumettre à l'action de l'antisérum et qui seule doit intervenir dans l'expérience, étant seule capable d'opérer l'hémolyse avec le concours de l'alexine de chèvre. Ils ne songent point qu'en agissant ainsi, en ajoutant à la dose A d'antisérum un pareil excédent de sérum lapin-bœuf, ils introduisent dans cet antisérum, non seulement beaucoup trop de sensibilisatrice spécifique (qui seule attire leur attention), mais encore une forte quantité de sensibilisatrices normales, lesquelles, nous le savons, accaparent et consomment la plus grande part de l'énergie antisensibilisatrice, empêchant ainsi, à l'insu de ces savants, l'annihilation par l'antisérum, de la sensibilisatrice spécifique exclusivement considérée. Naturellement les globules s'hémolysent, il ne saurait en être autrement. Pour rendre imperceptible l'influence protectrice de l'antisérum, il n'eût point été nécessaire d'y introduire un pareil excédent de sérum lapin-bœuf; il eût suffi que l'excédent fût constitué simplement de sérum de lapin neuf. Et dans ces conditions, aucune protection des globules n'eût été observée, même si l'on avait employé, au lieu d'alexine de chèvre, de l'alexine de cobaye. Les laborieuses considérations de MM. Ehrlich et Morgenroth sur la nature des antisensibilisatrices, sur la multiplicité des anticorps et notamment des sensibilisatrices dans un même immunsérum, résultent d'une compréhension fautive et erronée des résultats expérimentaux. On voit par cet exemple que l'argumentation

employée pour défendre la théorie des chaînes latérales est loin d'être toujours inattaquable; elle est, dans certains cas, fort sujette à critiques et ne saurait être acceptée sans discussion.

Théories de l'immunité passive. — L'immunité conférée par l'injection de sérum préventif présente certaines particularités qui dans ces derniers temps surtout, ont beaucoup attiré l'attention. On pensait autrefois que l'organisme auquel on administre par exemple de l'antitoxine, et qui bénéficie du pouvoir protecteur de cet anticorps, se comporte comme un dépositaire passif de la substance immunisante, sans réagir contre elle, sans rien élaborer qui puisse l'annihiler, même si le sérum injecté provient d'un animal différent de celui que l'on traite. Et si l'immunité passive est fugace, cela tient simplement toujours, croyait-on, à ce que les anticorps sont éliminés peu à peu, sans subir toutefois d'altération dans l'organisme. C'était l'opinion générale, et nous la partagions, lorsqu'en 1895 nous avons fait connaître le fait de la collaboration nécessaire des deux substances (sensibilisatrice, alexine) dans la bactériolyse du vibrion cholérique. L'animal immunisé par le choléra-sérum et qui corrélativement acquiert, comme l'avaient montré Fraenkel et Sobernheim, l'état bactéricide des humeurs, doit, nous avons pu nous en convaincre. ce pouvoir microbicide nouveau d'une part à ce qu'il possédait déjà antérieurement, comme tout animal neuf, l'une des substances indispensables (alexine), d'autre part à ce qu'on lui procure la seconde, la sensibilisatrice spécifique, présente dans le choléra-sérum injecté. Le pouvoir bactéricide naît donc dans les humeurs de l'animal traité comme il apparaît dans un tube à réactif contenant du sérum frais d'animal neuf auquel on ajoute un peu de sensibilisatrice anticholérique; dans les deux cas, il reconnaît pour cause la rencontre de deux substances [1]. Et si l'immunité disparaît bientôt, c'est que la sensibilisatrice répandue dans les humeurs se perd peu à peu par élimination simple.

Cette explication du fait que l'immunité passive est fugace reste sans doute vraie dans les cas où l'organisme reçoit du sérum provenant d'un animal de même espèce. Mais, quand cet animal appartient à une espèce différente, la durée de l'immunité passive se montre, divers observateurs l'ont constaté, remarquable-

1. Ces *Annales*. Juin 1895, p. 506.

ment brève [1]. Et MM. Pfeiffer et Friedberger, à propos précisément du choléras érum, ont émis cette hypothèse fort plausible que si dans de tels cas l'immunité passive s'évanouit très vite, cela tient à ce que *l'organisme traité combat lui-même les matières actives* injectées, en élaborant des principes antagonistes, notamment des antisensibilisatrices, susceptibles de les annihiler.

On doit dès lors se demander si, en injectant à des animaux d'espèce A des immunsérums quelconques (antitoxines, agglutinines, lactosérum, etc.) provenant d'une espèce B, on obtiendra régulièrement, dans tous les cas, des antisérums comparables à ceux qui neutralisent les sensibilisatrices hémolytiques et que nous avons étudiés. Nous l'avons vu, MM. Pfeiffer et Friedberger ont obtenu un anticholérasérum. M. Schütze [2] a obtenu un antilactosérum. Mais MM. Kraus et Eisenberg [3], qui ont fait dans cette voie des tentatives nombreuses et systématiques, n'ont pu constater, chez le lapin, la production d'anticorps capables de neutraliser l'antitoxine diphtérique de chèvre, l'agglutinine typhique de cheval. Les résultats sont donc fort disparates. Pourquoi la loi qui régit ces phénomènes ne semble-t-elle pas générale?

Pour concilier ces données contradictoires, on a émis, cela va de soi, l'explication suivante, conforme à la théorie d'Ehrlich : L'antitoxine diphtérique, l'agglutinine typhique ne manifestent d'affinité que pour certains récepteurs propres aux bacilles diphtériques ou typhiques. Il est fort naturel qu'elles restent libres dans l'organisme auquel on les injecte, car elles n'y trouvent point de récepteurs appropriés; ceux-ci, faisant défaut, ne peuvent être reproduits en abondance, et par conséquent on n'obtient point d'antisérum actif. On peut objecter à cette explication que, si elle était vraie, MM. Pfeiffer et Friedberger n'auraient point obtenu d'antisensibilisatrice active à l'égard du cholérasérum. Mais il suffit, d'autre part, pour que cette remarque soit réfutée à son tour, de dire que, si l'organisme ne possède pas de récepteurs identiques à ceux des bacilles typhiques ou diphtériques (susceptibles par conséquent, d'abord, de fixer

1. Voir notamment, à ce propos, parmi les travaux récents : SCHUTZE, *Ueber das Verschwinden verchiedener. Immunsera aus dem tierischen Organismus. Festschr. v.* 60 *geburtst. v. R. Koch*, p. 657.
2. *Berliner Klin. Wochenschrift*, 1901, n° 50, p. 1263.
3. *Centralblatt für Bakteriologie.* Originale, 1902, t. XXXI, p. 208.

les matières actives impressionnant ces microbes, ensuite, de se reproduire) il en possède au contraire qui ressemblent fort à ceux du vibrion cholérique. Et si l'expérience avait montré l'inverse, c'est-à-dire qu'on obtient plus facilement un antityphosérum qu'un anticholérasérum, il eût été opportun d'affirmer, au sujet de l'existence ou de l'absence des récepteurs, exactement le contraire. Bref, qu'on obtienne ou non l'antisérum que l'on cherche, ces résultats opposés sont tous deux également favorables à la théorie des récepteurs; en cas d'insuccès, ceux-ci manquent; ils existent si l'on réussit. Quoi qu'il arrive, leur intervention facilite, dans une large mesure, la compréhension des faits.

Il est néanmoins possible, pour expliquer la divergence des résultats, de proposer une autre explication. Nous l'avons vu, quand on immunise des cobayes contre le sérum de lapin neuf, ces animaux fournissent un antisérum qui neutralise indifféremment soit diverses sensibilisatrices spécifiques de lapin (lapin-bœuf ou lapin-poule par exemple), soit les sensibilisatrices normales (ou les substances d'ailleurs peu connues, appartenant à cette catégorie) du sérum de lapin neuf. Bien plus, *une seule et même* antisensibilisatrice confère à l'antisérum ses propriétés antagonistes, est susceptible en d'autres termes de manifester ces affinités diverses en s'unissant aux différentes sensibilisatrices.

Il suit de là que, si l'on désire neutraliser efficacement, sans grande dépense d'antisérum, une sensibilisatrice spécifique déterminée (disons pour préciser la sensibilisatrice lapin-bœuf), il est fort utile d'obtenir tout d'abord celle-ci à l'état pur, sans mélange d'autres sensibilisatrices, avant de la soumettre à l'action de l'antisérum. L'énergie neutralisante de ce dernier est alors, dans sa totalité, exclusivement dirigée sur cette sensibilisatrice isolée : on la concentre, on la fait converger uniquement vers le but poursuivi. Cette purification de la sensibilisatrice était réalisée dans nos expériences, grâce à l'absorption élective opérée par les globules mélangés de sérum lapin-bœuf [1]. Mais, si l'on néglige cette précaution, si par exemple on

1. A vrai dire, il serait désirable que l'on pût se procurer, par un autre moyen, une sensibilisatrice spécifique à l'état pur. On pourrait alors (ce qui serait de beaucoup préférable) la soumettre à l'action de l'antisérum avant de la mettre en contact avec les globules sensibles. Cette technique est jusqu'à présent inexécutable; mais elle est théoriquement beaucoup mieux appropriée que celle dont nous avons dû faire usage. En effet, il se pourrait qu'une antisensibilisatrice fût

mélange tout d'abord l'antisérum à l'immunsérum complet qui, à côté de la sensibilisatrice spécifique soumise à l'étude, contient d'autres principes analogues, on dissémine en pure perte l'effet neutralisant. Lorsqu'à nos globules sensibilisés nous ajoutions, soit avant, soit même après les avoir mélangés à l'antisérum, des sensibilisatrices normales sous forme de sérum de lapin neuf 56° (ou bien sous forme de sérum lapin-bœuf expurgé au préalable de sa sensibilisatrice spécifique par contact antérieur avec des globules de bœuf), la guérison des globules était gravement compromise, parce que le pouvoir neutralisant cessait d'être concentré uniquement sur la sensibilisatrice dont le sort des globules dépendait. Si donc on mélange simplement (comme on le fait d'habitude) l'antisérum avec l'immunsérum complet contenant la sensibilisatrice spécifique (ou l'antitoxine, ou l'agglutinine, — car les remarques que nous venons d'émettre peuvent s'appliquer, semble-t-il, à l'ensemble des recherches relatives aux anti-anticorps) dont on veut abolir l'énergie, les *chances que l'on aura de constater la neutralisation prévue dépendront de la teneur de l'immunsérum en sensibilisatrices respectivement spécifique et normales.* Plus celles-ci seront abondantes, moins la spécifique sera atteinte par l'antisérum, et l'atténuation qu'elle subira pourra être si faible, que l'observation ne la dénotera plus. Et si les antisensibilisatrices — on pourrait dire aussi les anti-antitoxines — ont la réputation d'être des substances antagonistes d'une énergie plutôt médiocre — parfois même nulle — cela tient en partie tout au moins à ce que nous ne constatons point, dans leur ensemble, les effets qu'elles produisent. Quand nous exigeons d'elles qu'elles neutralisent un anticorps déterminé, quand nous leur présentons un immunsérum, nous ne tenons pas compte de ce que leur pouvoir s'épuise à saturer d'autres matières présentes aussi dans l'immunsérum, mais que notre expérimentation néglige et que nous ignorons. Il serait étrange que la proportion relative des substances

incapable de guérir des globules sensibilisés, tout en se montrant efficace lorsqu'on la fait agir sur la sensibilisatrice à titre préventif, c'est-à-dire avant que celle-ci n'ait touché les globules. On peut prévoir en effet, comme nous le disons plus loin, qu'une lutte doit se passer entre les affinités que la sensibilisatrice manifeste d'une part pour le globule, de l'autre pour l'antisensibilisatrice. Et si, dans certains cas, la combinaison de la sensibilisatrice avec le globule se montrait très stable et peu attaquable, il se pourrait qu'elle ne fût pas influencée notablement par l'addition ultérieure d'antisensibilisatrice. De tels cas se rencontreront peut-être.

actives, normales d'une part, spécifiques de l'autre, fût toujours la même dans les immunsérums, quels que soient les exemples choisis, quelles que soient aussi les espèces animales dont le sérum provient. Il faut donc s'attendre à ce que les anti-anticorps ne soient pas toujours décelables par l'expérience. De là sans doute l'irrégularité des résultats obtenus. Mais d'autres facteurs encore interviennent, susceptibles d'influencer ces résultats. Des affinités diverses entrent en conflit dans les expériences de ce genre. Il y a l'affinité de l'anti-anticorps pour l'anticorps spécifique, ou pour les substances normales de même catégorie, il y a l'affinité de l'anticorps spécifique pour l'élément ou matière sensible qui sert de réactif. Il faut considérer en outre la plus ou moins grande vulnérabilité de cet élément, la plus ou moins grande stabilité de cette matière sensible. La résultante de ces facteurs divers est seule à nous apparaître et peut être variable, les résultats semblant dès lors incohérents, sans que les lois qui régissent ces phénomènes cessent d'être générales. L'étude de l'immunité est fertile en exemples que l'on peut invoquer à ce propos. C'est une loi générale que l'injection de microbes provoque l'apparition de sensibilisatrices, et nous savons que celles-ci tendent à exalter l'activité microbicide de l'alexine; c'est pourtant un résultat assez exceptionnel que d'obtenir un immunsérum fortement bactéricide pour les microbes inoculés. Pourquoi? Parce que s'il existe des microbes délicats, pour lesquels les sérums de vaccinés sont funestes, il en existe beaucoup d'autres qui sont plus résistants, et qui, ensemencés dans un semblable milieu, n'y subissent comme M. Metchnikoff l'a prouvé par tant d'exemples démonstratifs, aucune avarie.

Lorsqu'on injecte aux animaux un immunsérum dans l'espoir d'obtenir un anti-anticorps, on obéit assez naturellement à cette idée directrice que l'animal va diriger particulièrement ses efforts contre l'anticorps qui intéresse et monopolise l'attention. Si l'expérience réussit et porte par exemple sur le choléraserum, si en outre on est partisan de la théorie d'Ehrlich, on énoncera cette conclusion que l'animal fournit un anticholérasérum parce qu'il a surproduit des récepteurs assez analogues à ceux dont le vibrion cholérique est doué. En réalité les choses ne se passent pas ainsi. Si la cholérasensibilisatrice est

touchée, elle ne le sera point en raison de ses qualités spécifiques et particulières, en raison de ce fait qu'elle impressionne le vibrion cholérique. Si elle est neutralisée, ce n'est point « à titre personnel », si l'on peut s'exprimer ainsi; c'est uniquement parce qu'elle appartient, comme toute autre sensibilisatrice (et sans doute aussi comme les antitoxines) à une catégorie de substances qui déterminent une réaction, lorsque, provenant d'une espèce A, elles sont injectées à une espèce B. Et si un langage très familier était permis, on pourrait dire que l'animal injecté ne s'inquiète nullement de savoir si l'anticorps qu'on lui administre influence les toxines tétanique ou diphtérique, ou bien encore impressionne les microbes cholérique ou typhique; les récepteurs de ces bacilles, les groupes haptophores de ces toxines le laissent indifférent et ne commandent guère sa réaction.

Mais ces anticorps appartiennent à la famille des matières actives du sérum. Ce que l'animal sait, ce contre quoi il proteste, c'est que certains membres de cette famille (sinon tous) déterminent en lui un certain trouble, lorsqu'il ne les a point élaborés lui-même, lorsqu'ils portent le cachet d'une espèce étrangère. N'oublions pas, au surplus, que l'injection d'immunsérum comporte non seulement celle d'un anticorps spécifique, *mais aussi celle de sérum neuf*. Percevant donc la présence inusitée de ces matières étrangères, l'organisme sécrète une substance antagoniste. Et il se fait que celle-ci *n'a pas de spécificité stricte*, ne choisit pas telle matière active plutôt que telle autre. Elle peut donc servir à protéger, dans les expériences, soit des microbes, soit des globules divers, contre les anticorps appropriés dont on dispose. Si donc on peut neutraliser des anticorps spécifiques en se servant d'antisérum provenant d'animaux injectés simplement de sérum neuf (pourvu que ces anticorps spécifiques et ce sérum neuf aient été fournis par la même espèce animale, différente de celle qui a subi l'injection) — cela tient précisément à ce que l'antisérum porte son action sur la catégorie tout entière des matières actives.

Certes, on ne saurait nier que la réaction de l'animal pourra (théoriquement du moins) être plus intense s'il reçoit du sérum manifestant à son égard une très forte toxicité, s'il reçoit par exemple un immunsérum dont la spécificité est dirigée précisé-

ment contre ses propres cellules[1]. Toutefois, ce n'est point là, nous l'avons vu, une condition indispensable à l'apparition de la réaction — ce qu'on conçoit facilement du reste, car le sérum normal lui-même produit toujours certains effets nuisibles sur les organismes d'espèce différente.

Mais, lorsqu'on voit un organisme injecté d'un immunsérum spécifiquement actif à l'égard de microbes ou de cellules quelconques n'ayant absolument rien de commun avec cet organisme, réagir en sécrétant une matière antagoniste capable de neutraliser l'anticorps injecté, on ne pourrait légitimement conclure, nous semble-t-il, à *l'existence nécessaire d'une identité ou d'une étroite parenté* de constitution entre les éléments cellulaires de l'organisme et ceux (microbes, cellules, produits microbiens etc.) vis-à-vis desquels le sérum injecté manifeste électivement ses propriétés spécifiques. Il n'y a point lieu de faire intervenir l'idée de la communauté des récepteurs. En réalité, dans de tels cas, l'antisérum ne diffère pas de celui qu'on aurait obtenu en injectant simplement du sérum neuf; il porte, nous le répétons, globalement et indistinctement son action sur la classe toute entière des matières actives que le sérum étranger est susceptible de renfermer.

Nous croyons donc que l'extrême fugacité de l'immunité passive créée par l'injection de sérum étranger doit réellement être attribuée à ce que l'organisme tend, en règle très générale, à sécréter une substance antagoniste. Si la présence de celle-ci ne se décèle pas toujours facilement dans les expériences, cela tient à ce que diverses conditions sur lesquelles nous avons insisté plus haut doivent être réunies pour que les effets de cette substance se développent efficacement. Ceux-ci dépendent des doses employées et vraisemblablement aussi des affinités que manifestent les éléments divers participant à la réaction. Pour ce qui concerne les doses, il faut remarquer que lorsqu'on injecte un immunsérum dans le but de conférer l'immunité passive, la dose de sérum administrée est toujours très faible relativement à la masse de sang de l'animal traité; dans ces conditions, le pouvoir antagoniste qui se développe bientôt a plus de chances de se manifester que dans les expériences où l'on

1. Remarquons cependant que MM. Kraus et Eisenberg n'ont point obtenu, en injectant à des chiens un immunsérum spécifiquement actif à l'égard des globules de cet animal, d'antisérum dont l'efficacité ait pu être décelée.

a souvent une tendance à faire intervenir l'antisérum à dose véritablement trop minime.

*
* *

CONCLUSIONS

Un antisérum obtenu par injection, à des animaux d'espèce A, de sérum neuf d'espèce B, donne lieu aux observations suivantes :

I. Des globules rouges divers, sensibilisés par des sérums hémolytiques appropriés (chauffés au préalable à 56°) provenant de l'espèce B, perdent leur sensibilisation à l'alexine si on les met en contact avec l'antisérum. Toutefois la sensibilisation est plutôt fort atténuée que complètement abolie ; elle peut en effet se manifester encore si les globules sont placés dans un milieu défectueux qui diminue leur résistance (solution physiologique).

II. Pour obtenir un antisérum capable de neutraliser différentes sensibilisatrices spécifiques qu'une même espèce B peut élaborer sous l'influence de traitements immunisants, il n'est pas nécessaire d'injecter aux animaux ces sensibilisatrices spécifiques, il suffit de leur injecter du sérum normal d'espèce B.

III. Le pouvoir que l'antisérum ainsi obtenu possède de neutraliser ces diverses sensibilisatrices spécifiques et aussi les anticorps du sérum neuf B (sensibilisatrices normales) doit être attribué à la présence dans cet antisérum d'une antisensibilisatrice unique. Il n'y pas lieu d'admettre la multiplicité des antisensibilisatrices dans un même antisérum. Au point de vue de l'influence de l'antisensibilisatrice, il y a plus de parenté entre des sensibilisatrices de provenance commune, mais actives à l'égard d'éléments différents, qu'entre des sensibilisatrices actives sur le même élément, mais qui ont été élaborées par des organismes divers.

IV. L'antisensibilisatrice se consomme en agissant. Des globules sensibilisés introduits dans l'antisérum enlèvent à ce dernier le pouvoir de protéger désormais de nouveaux globules sensibilisés soit de même espèce, soit d'espèce différente. — De même, les anticorps normaux du sérum neuf B neutralisent l'antisérum.

V. L'antisérum guérit les globules sensibilisés en se combi-

nant à la sensibilisatrice spécifique fixée elle-même sur ces derniers. Les globules ainsi préservés résistent à l'alexine même si on les débarrasse par le lavage de l'excès du sérum protecteur.

VI. Tout se passe comme si le complexe formé par l'union de l'antisensibilisatrice avec la sensibilisatrice spécifique soudée au globule pouvait être décomposé (la sensibilisation réapparaissant) lorsqu'on le soumet à l'action des anticorps normaux (sérum neuf B ou bien encore immunsérum d'espèce B dépouillé au préalable de son anticorps spécifique par contact avec l'élément sensible approprié), ceux-ci étant capables de s'emparer d'une partie tout au moins de l'antisensibilisatrice précédemment combinée à la sensibilisatrice spécifique.

VII. Le pouvoir de s'opposer à l'influence curatrice de l'antisérum sur les globules sensibilisés, que le sérum neuf B manifeste grâce aux anticorps normaux qu'il contient, résiste à la température de 70°, mais non à celle de 100°. On ne le constate pas dans l'humeur aqueuse d'espèce B. Il a été démontré antérieurement que l'humeur aqueuse des animaux vaccinés ne contient pas de sensibilisatrices spécifiques.

VIII. En saturant la sensibilisatrice fixée sur les globules, l'antisérum enlève à ces derniers la faculté (conférée par la sensibilisation) d'absorber l'alexine.

IX. On doit considérer comme insuffisamment démontrée l'opinion de certains auteurs relative à l'identité des anticorps, impressionnant le même élément sensible, et que l'on trouve dans le sérum, d'une part des animaux neufs, d'autre part des animaux de même espèce immunisés contre cet élément.

X. La théorie d'Ehrlich, d'après laquelle les anticorps spécifiques seraient identiques aux récepteurs cellulaires combinables aux substances contre lesquelles l'organisme est immunisé, est erronée. Les arguments tirés de l'étude des antisensibilisatrices, et qui ont servi à étayer cette théorie, ne sont pas valables. La thèse qu'un même immunsérum hémolytique renferme plusieurs sensibilisatrices spécifiques distinctes n'a pas reçu de sanction expérimentale. L'idée de la déviation du complément par un excès de sensibilisatrice est purement hypothétique.

XI. La brièveté de l'immunité passive conférée par une injection d'immunsérum d'espèce étrangère semble bien due à ce que l'organisme, en règle très générale, élabore une matière

antagoniste. L'influence de celle-ci n'est pas spécialement dirigée contre l'anticorps spécifique qui a conféré l'immunité. Elle s'exerce, d'une manière globale, sur l'ensemble des anticorps (normaux ou spécifiques) que le sérum étranger renferme. La production de la matière antagoniste n'est donc nullement subordonnée à l'existence d'une identité ou d'une étroite parenté de constitution entre les éléments cellulaires de l'organisme et ceux (microbes, cellules quelconques, poisons, etc.) vis-à-vis desquels le sérum injecté manifeste électivement ses propriétés spécifiques. Il n'y a pas lieu, en d'autres termes, de faire intervenir l'idée de la communauté des récepteurs

---

Recherches sur la glycolyse des organes des mammifères.

Par P. PORTIER.

Travail du laboratoire de M. Gab. Bertrand.

Historique. — Au cours de l'année 1903, Stoklasa fit paraître une série de mémoires qui avaient pour but d'établir la possibilité d'extraire des tissus des végétaux, et même des organes des animaux supérieurs, un ferment soluble analogue ou identique à la zymase de Büchner; qui, par conséquent, provoquait la décomposition des sucres, du glucose par exemple, en un mélange d'alcool et d'acide carbonique.

L'intérêt de cette découverte était considérable, aussi bien au point de vue de la physiologie générale que de la pathologie; les travaux sur la question se multiplièrent : nous allons d'abord les exposer successivement et en faire la critique.

Le premier travail de Stoklasa paru dans le *Journal de Hofmeister* [1], a trait à la respiration anaérobie des plantes supérieures (raves, pois, etc.). Il montre que cette respiration est identique à la fermentation alcoolique; formation de CO^2, d'alcool éthylique et des produits accessoires habituels.

En employant un procédé analogue à celui de Büchner (organes broyés et soumis à 300 atmosphères de pression), il obtient un suc qui, traité par l'alcool et l'éther, fournit un ferment soluble capable de produire *in vitro* la fermentation alcoolique. Résultats analogues d'ailleurs avec les plantes non soumises à l'asphyxie.

Stoklasa ne tarde pas à étendre ses recherches aux tissus des animaux.

Il aurait constaté d'abord que des organes entiers (cœur, poumons, etc.), prélevés aseptiquement aussitôt après la mort de l'animal, plongés dans une solution faible de sublimé, puis introduits dans une solution de glucose en présence d'une atmosphère d'hydrogène, provoque la décomposition du glucose

1. Voir les indications bibliographiques à la fin du mémoire.

en alcool et acide carbonique. L'action n'est pas négligeable puisqu'un cœur de chien, du poids sec de 21 grammes, produit en 10 jours 1gr,966 d'acide carbonique et 2gr,09 d'alcool.

Il serait possible d'extraire la zymase des organes en les hachant, les broyant avec du sable, et soumettant la masse à la presse hydraulique à 300 ou 400 atmosphères. Le liquide obtenu, précipité par un mélange d'alcool et d'éther, fournirait une poudre qui posséderait toutes les propriétés de la zymase. Le mélange obtenu en délayant cette poudre dans l'eau pourrait même être filtré sur terre d'infusoire sans perdre ses propriétés, puisqu'à 37°, elle produirait une fermentation immédiate [1].

Il existerait donc dans les différents organes (cœur, foie, muscle, etc.) des animaux supérieurs un ferment analogue à la zymase.

L'auteur assure s'être prémuni contre l'invasion possible des bactéries, et n'avoir tenu compte que des recherches où les cultures des liquides d'expérience sur bouillon et sur gélatine n'ont donné que des résultats négatifs, ou tout au moins n'ont décelé que des bactéries incapables elles-mêmes de produire les effets observés.

Feinschmidt cherche à reproduire les expériences de Stoklasa; il arrive à peu près aux mêmes conclusions, mais signale l'influence néfaste exercée par les antiseptiques sur le ferment de Stoklasa.

Simacek s'attache à isoler le ferment du pancréas, il y parvient; mais à la lecture de son travail, on est étonné du procédé employé pour faire la part de l'action due au ferment soluble et de celle due aux bactéries; nous reviendrons sur cette question.

Son travail ne tarde pas à être critiqué par Conheim qui n'obtient la glycolyse que par le mélange du suc de pancréas à celui de muscle.

Bientôt paraissent de nouveaux mémoires de Simacek, de Stoklasa seul ou en collaboration avec Czerny, où les auteurs s'efforcent de réfuter les critiques de Conheim et insistent sur ce fait que l'action observée ne tient pas à la présence de bactéries. Batelli, employant la méthode indiquée par Stoklasa, constate que dans les solutions additionnées d'une quantité suffisante d'antiseptique, il ne se produit pas trace de fermentation. Si

1. *Centralblatt f. Physiologie*, 14 février 1903, p. 656.

l'antiseptique est en quantité insuffisante, la fermentation alcoolique s'établit, mais on peut toujours, dans ce cas, déceler la présence de bactéries. Celles-ci se développent même dans les solutions contenant 30 0/0 de saccharose contrairement à l'opinion de Simacek.

La lecture attentive des différents mémoires de Stoklasa et de ses élèves révèle en effet une singulière méconnaissance de la biologie des bactéries.

C'est ainsi que Simacek, dans son mémoire du *Centralblatt F. Physiologie* du 18 juillet 1903, après avoir constaté qu'en 24 heures à 37° degrés il s'est produit de 650 à 720 milligrammes d'acide carbonique et de l'alcool, reconnaît que les bactéries interviennent dans le phénomène observé. Il cherche alors à faire la part de cette action des bactéries en ensemençant 5 c. c. du liquide d'expérience dans une solution à 10 pour 100 de saccharose. Dans ces recherches « de contrôle » ainsi que les qualifie l'auteur, il se forme la moitié (et quelque fois davantage) de la quantité d'acide carbonique des expérences type, et Simacek croit pouvoir en tirer la conclusion qu'une bonne part de l'action observée est due à la zymase. Aucun bactériologiste ne sera cependant étonné que des bactéries transportées d'un milieu donné dans un autre moins favorable (ici moins riche en albuminoïdes) « travaillent » moins bien que précédemment, et le fait de vouloir tirer des conclusions fermes d'une telle expérience jette une suspicion sur tout le reste du travail. L'auteur nous affirme bien, à la vérité, que les cultures faites avec d'autres liquides d'expérience sont restées stériles, mais on aimerait à savoir dans quelles conditions ont été faites ces cultures, quelle a été la quantité de liquide d'expérience employé pour l'ensemencement, etc.

L'examen des tableaux annexés aux mémoires de Stoklasa [1], montre que *pas une seule fois* l'auteur ne donne de dosage de l'alcool formé pour les expériences dans lesquelles un antiseptique a été employé.

Quant à la prétention de Simacek d'empêcher tout développement microbien en opérant avec des solutions de saccharose à 30 pour 100, elle n'est évidemment pas soutenable, et Batelli l'a

1. Voy. en particulier *Centralblatt f. Phisiologie*, 21 nov. 1903, p. 472.

réfutée. Les récentes expériences de Ch. Richet[1] ont d'ailleurs bien mis de nouveau en évidence la résistance aux antiseptiques de certaines bactéries, du ferment lactique en particulier qui, probablement, envahit souvent les liquides des expériences qui nous occupent; tous les auteurs qui ont travaillé ce sujet ont constaté l'acidification de leurs liqueurs. J'ai fait la même remarque[2].

Il y a enfin un point des expériences de Stoklasa sur lequel je désire appeler l'attention. L'auteur précipite le suc de presse par un mélange d'alcool et d'éther et, à plusieurs reprises, il insiste sur la nécessité de soustraire très rapidement le précipité au contact de l'alcool éther, qui affaiblit et détruit même bientôt l'action du ferment. Or le procédé employé par Stoklasa ne permet pas, comme il le dit, d'opérer en quelques minutes la séparation du précipité; si on laisse en effet, comme le fait l'auteur, le précipité gagner de lui-même le fond du vase, il faut un temps beaucoup plus long, et pouvant même atteindre plusieurs heures, pour que la séparation du liquide soit suffisante et qu'il soit possible d'en opérer la décantation; conditions tout à fait défavorables d'après Stoklasa lui-même, à la préparation d'une zymase douée d'une grande activité. Il m'a donc paru qu'il y avait une contradiction évidente entre les recommandations de l'auteur et son mode opératoire; j'ajoute qu'en répétant les expériences de Stoklasa, j'ai employé la centrifugation, ce qui m'a permis d'opérer la séparation instantanée du précipité ainsi qu'on le verra dans un instant.

Malgré l'incertitude des preuves fournies et les objections qui leur ont été adressées, Stoklasa et Simacek maintiennent énergiquement leurs conclusions.

Il m'a donc semblé intéressant de reprendre leurs expériences en me plaçant, pour la préparation du ferment, dans les conditions qui sont indiquées comme les plus favorables par les auteurs eux-mêmes.

Les conditions de l'action du ferment ont été de deux sortes :

1° Action à 36° pendant une durée assez longue (24 heures

1. Ch. Richet Études sur la fermentation lactique. — De l'action soi-disant antiseptique du chloroforme et du benzène, *Comptes rendus, Société de biologie* 1904. p. 216.

2. Stoklasa attribue à un ferment soluble la production de cet acide qu'il croit être de l'acide lactique.

par exemple) en présence d'un antiseptique présentant une sécurité absolue ponr l'élimination des bactéries (fluorure de sodium à 1 ou 2 pour 100).

2° Action à 30° ou 36°, en l'absence de tout antiseptique, ou en présence de chloroforme pendant une durée de quelques heures, (2 à 3). Stoklasa et Simacek ont en effet insisté à plusieurs reprises sur ce que, dans ces conditions très favorables, la fermentation s'établit instantanément (augenblicklich) et avec une telle intensité que le dégagement d'acide carbonique produit de la mousse à la surface du liquide. En 2 ou 3 heures on devra donc observer déjà une diminution très notable du sucre.

Quant aux expériences de longue durée (celles de Stoklasa on duré jusqu'à 10 jours) en présence d'un antiseptique insuffisant (toluène à 1 p. 100, etc.), je les ai écartées, les jugeant sans valeur aucune à cause de l'intervention des bactéries pour la démonstration d'un ferment soluble.

Mode opératoire. — Les organes d'animaux récemment tués (chevaux, porcs, chiens) étaient broyés[1] finement, puis triturés avec du sable siliceux soigneusement lavé, jusqu'à consistance d'une pâte assez ferme.

Cette pâte, enveloppée dans une forte toile, était ensuite soumise à l'action très progressive d'une presse hydraulique jusqu'à une pression finale de 250 à 400 kilogrammes par centimètre carré.

Le liquide, riche en albuminoïdes, obtenu par ce procédé était employé soit tel quel, soit traité par un mélange d'alcool et d'éther dans les proportions indiquées par Stoklasa[2] dans ses derniers travaux. Le précipité obtenu était rapidement séparé par la centrifuge, redélayé dans l'éther, et centrifugé de nouveau. Le précipité recueilli était essoré à la trompe et mis à sécher dans le vide sur l'acide sulfurique. On s'est toujours attaché à mener ces opérations avec la plus grande rapidité, et il ne s'écoulait *pas plus de* 10 *minutes ou un quart d'heure* entre le moment où on additionnait le suc de presse du mélange alcool-éther et celui où on plaçait le précipité dans le vide sec à 30 degrés. La

1. Dans certaines expériences sur le pancréas, organe particulièrement difficile à réduire en pulpe, nous nous sommes servis du broyeur imaginé par M. Borrel et que celui-ci a très obligeamment mis à notre disposition; nous lui adressons nos vifs remerciements. Dans les autres expériences, nous avons fait usage du broyeur Latapie.

2. Pour un volume de liquide, on employait un volume d'alcool à 96° et un volume d'éther.

poudre obtenue était employée dans les deux jours suivants, ou au plus une semaine après [1].

Pour étudier l'action sur une solution de glucose, on préparait toujours en même temps deux flacons identiques, dont l'un était analysé immédiatement et dont l'autre était analysé après un séjour déterminé à l'étuve, en se plaçant rigoureusement dans les mêmes conditions que pour le premier. La comparaison des deux résultats devait donner la quantité de sucre disparu.

La précipitation des albuminoïdes pour le dosage du sucre était faite au moyen du nitrate mercurique par un procédé analogue à celui qui a déjà été employé pour la précipitation des matières albuminoïdes du sang [2].

Expérience I. — Pancréas de porc.

Solution de NaFl à 1/100	50 c. c.
Glucose	2 grammes.
Suc de presse non précipité par l'alcool-éther	25 c. c.

On laisse 44 heures à 36° et 24 heures à 15°.

L'analyse à ce moment donne $2^{gr},01$ de glucose. Soit une différence en plus de 0,6 pour 100, ce qui rentre dans la limite des erreurs analytiques.

Conclusion. Donc, pas de consommation de sucre.

Expérience II. — Pancréas de cheval.

Eau distillée	50 c. c.
Glucose	2 gr. 50
Suc de presse non précipité	25 c. c.

Chloroforme à saturation.
On laisse 20 heures à 36°.

On constate alors une différence en moins de $0^{gr},039$ de glucose, soit une diminution de 1,5 pour 100 rentrant à peu près dans les erreurs de dosage.

Expérience III. — Pancréas et muscles de chien, isolés ou associés.

A. Suc de presse de muscle non précipité	50 c. c.
Glucose	1 gramme.

Pas d'antiseptique.
2 heures à 36°.

L'analyse trouve $1^{gr},011$ de glucose.

Différence en plus de 1,1 pour 100, rentrant dans les erreurs d'analyse.

1. Stoklasa insiste en effet sur ce que la zymase se détruirait assez rapidement
2. Voy. Bierry et Portier, *Comptes rendus de la Société de Biologie.*

B. Suc de presse de muscle non précipité	....	45 c. c.
— — pancréas —	....	5 c. c.
Glucose	....	1 gramme.

2 heures à 36°, sans antiseptique.

L'analyse donne 1gr, 007 de glucose. Soit une différence en plus de 0,7 pour 100, rentrant dans les erreurs d'analyse.

C. Suc de presse de muscle non précipité	....	31 c. c.
— — pancréas —	....	5 c. c.
Fluorure de sodium à 4 0 0	....	14 c. c.
Glucose	....	1 gramme.

25 heures à 36°.

On retrouve juste 1 gramme de glucose.

Expérience IV. — Muscle de bœuf.

Du muscle de bœuf traité à la manière habituelle est soumis à la pression de la presse hydraulique. Le liquide qui s'écoule pendant les premières phases de l'opération, c'est-à-dire pendant que la pression varie de 0 à 75 kilogrammes par centimètre carré,est rejeté; d'après Stoklasa, il contiendrait en effet peu de ferment.

Le liquide s'écoulant de 75 à 300 kilogrammes par centimètre carré est précipité par l'alcool-éther.

On prépare le flacon :

Eau distillée	....	10 c. c.
Précipité sec	....	3 grammes.
Glucose	....	1 gr. 5

4 heures à 30°, sans antiseptique.

L'analyse donne 1 gr. 59, soit une différence en plus de 0gr,09, ou 6 0/0.

Remarque. Cette production de sucre s'opère probablement aux dépens du glycogène contenu dans le muscle. Il serait possible que ce phénomène vint masquer l'action de la zymase, aussi m'a-t-il paru dans ce cas utile de rechercher la présence de l'alcool.

Pour cela, les 2/3 du liquide d'analyse du flacon sont légèrement acidifiés par l'acide sulfurique, on distille 3c. c. au moyen de l'appareil de Schlœsing. On additionne ce distillat de potasse ; caustique et d'iodure de potassium ioduré ; on perçoit immédiatement une odeur d'iodoforme.

D'autre part, 1 goutte d'alcool à 75° est mélangé à 3 c. c. d'eau ; on traite de la même manière que précédemment, et on obtient

un dépôt de cristaux d'iodoforme supérieur à celui du liquide d'expérience. Il n'existerait donc dans ce liquide que des traces d'alcool.

Expérience V. — Foie de bœuf.

Comme dans l'expérience précédente, on recueille seulement le suc de presse qui s'écoule de 75 à 390 kilogrammes par centimètre carré. On précipite par l'alcool-éther.

On prépare les flacons :

A.	Eau distillée	10 c. c.
	Glucose	1 gr. 50
	Précipité	3 grammes.
B.	Eau distillée	10 c. c.
	Précipité	3 grammes.

Pas de glucose.

Les flacons sont laissés 3 heures et demie à 30 degrés sans addition d'aucun antiseptique.

On procède à ce moment à leur analyse, et on trouve que

A	contient	1 gr. 61 de glucose.
B	—	0 gr. 19 —

Donc, encore ici, on ne constate aucune disparition de sucre, il y a même apparition dans le flacon A de 1,61 — 1,50 = $0^{gr},11$ de glucose. Ce glucose s'est formé aux dépens du glycogène existant dans la liqueur, c'est ce que révèle l'examen du flacon B, dans lequel il s'est formé $0^{gr},19$ de sucre. On voit que dans ce flacon B. il s'est formé plus de sucre que dans A ($0^{gr},19$ au lieu de $0^{gr},11$), soit $0^{gr},08$ en plus ; ce qui n'a rien d'étonnant, la saccharification du glycogène par les ferments, dans A. étant entravée par la présence du glucose ajouté.

Expérience VI. — Poumon de bœuf.

Suc de presse obtenu en pressant de 0 à 375 kilogr. par centimètre carré, et précipité par l'alcool-éther.

On prépare les flacons.

A.	Eau distillée	10 c. c.
	Glucose	1 gr. 50
	Précipité	3 grammes.
B.	Eau distillée	10 c. c.
	Précipité	3 grammes.

Pas de glucose.

On laisse les flacons 3h. 1/2 à 30° sans antiseptique.

Au bout de ce temps, l'analyse démontre que :

A contient	....	1 gr. 45
B —	....	0 gr. 01

On voit donc qu'il a disparu $0^{gr},05$ de glucose, ce qui donne une différence de 3,09 pour 100.

En tenant compte de B, il aurait même disparu au plus $0^{gr},06$ de glucose.

En distillant une portion des liquides des flacons A, B et du flacon C immédiatement analysé, et dosant l'alcool au moyen du bichromate de potasse et de l'acide sulfurique, on constate que :

A contient	....	3	milligrammes	d'alcool.
B —	....	8	—	—
C —	....	3	—	—

On voit donc que les petites quantités d'alcool qui existent dans les flacons ne sont nullement en rapport avec les quantités de glucose disparu.

Conclusions. — 1° En présence d'antiseptiques suffisants, comme le fluorure de sodium à 1 pour 100, les sucs de presse des différents organes agissant à 36° et pendant 2 jours ne produisent aucune glycolyse ;

2° En l'absence d'antiseptique ou en présence de chloroforme, les sucs de presse (ou leurs précipités) agissant pendant 2 à 3 heures à la température de 30° à 36° ne sont encore capables de produire aucune glycolyse [1].

Avec le suc de certains organes riches en glycogène, on observe même une augmentation du pouvoir réducteur, ce qui tient à une transformation du glycogène sous l'influence de de l'amylase et de la maltase des tissus ;

3° Jamais, dans les conditions précédentes, on n'observe de formation d'alcool en quantité appréciable.

J'ai toujours constaté, au cours de manipulations (broyage, extraction à la presse hydraulique), que les liquides d'expérience prenaient une réaction nettement acide, probablement due au développement des bactéries.

En résumé, il m'a été impossible de retrouver les faits décrits par Stoklasa et Simacek, *même en réunissant toutes les conditions expérimentales les plus favorables* indiquées par ces auteurs.

1. Les faibles quantités de glucose disparues dans quelques cas rentrent dans la valeur des erreurs d'expérience.

Je pense que la consommation du glucose, dans les expériences de longue durée des auteurs précités, tient au développement de bactéries en présence d'antiseptiques insuffisants. Quant à la fermentation instantanée est intense qu'elle s'accompagne de productien de mousse, je renonce à l'expliquer, je constate seulement que je ne l'ai jamais remarquée.

En terminant, je ferai remarquer que je n'ai opéré que sur de glucose, mais d'après les auteurs précédents, Simacek en particulier, les bioses (saccharose, lactose) subiraient très énergiquement la fermentatinn alcoolique sous l'action des sucs de presse des différents organes. Cette fermentation s'accomplirait en deux temps : 1° dédoublement du biose sous l'influence d'un ferment soluble approprié (invertine, lactase), 2° fermentation les hexoses formés sous l'influence de la zymase. Cette zymase d'après Stoklasa et Simacek serait très fragile; elle n'agirait pas en présence des antiseptiques en quantité suffisante pour empêcher le développement des bactéries; elle se détruirait spontanément dans l'espace d'une douzaine de jours. Mais on connaît bien les autres ferments (invertine et lactase), on sait qu'ils se conservent longtemps à l'état sec, qu'ils agissent bien, même en présence de fluorure de sodium à 1 pour 100. On devrait donc pouvoir facilement constater la présence de ces ferments dans les sucs de presse des différents organes, sucs précipités par l'alcool-éther et conservés depuis 15 jours ou un mois. J'ai entrepris quelques expériences à ce sujet et elles ne m'ont donné que des résultats négatifs. J'ai confié les précipités que j'ai obtenu au moyen des différents sucs à MM. Bierry et Permilleux; leurs résultats, qui seront publiés prochainement, sont aussi nettement contraires à la présence de lactase ou d'invertine dans les sucs de presse; ils viennent donc aussi à l'encontre des résultats de Stoklasa et Simacek.

C'est grâce aux bons conseils que m'a prodigués M. G. Bertrand que j'ai pu mener à bien ce travail; qu'il me soit permis de lui adresser ici mes sincères remerciements.

BIBLIOGRAPHIE

1903. STOKLASA, Dr JULIUS, Der anaërobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehungen zur alkoholischen Gährung. (*Hofmeisters Beiträge*, Bd III, Heft. 11 u. 12.)

1903. STOKLASA, Dr JULIUS (unter Mitwirkung des Assistenten Černy), Ueber die anaërobe Athmung der Thierorgane und über die Isolierung eines gährungserregenden Enzyms aus dem Thierorganismus. (*Centralblatt für Physiologie*, XVI, 1903, s. 652.)

1903. STOKLASA, Dr JULIUS, Beiträge zür Kenntnis der aus der Zelle höher organisierter Tiere isolierten, gährungserregenden Enzyme. (*Centralblatt für Physiologie*, XVII, 1903, s. 465.)

1903. STOKLASA, Dr JULIUS, et CZERNY, Beiträge zür Kentniss der aus der Zelle höher organisirter Thiere isolierten gährungserregenden Enzyme. (*Berichte der deutsch. chemisch. Gesellschaft*, 1903, 63, s. 4058.)

1903. ARNHEIM, Dr JULIUS, und ROSENBAUM, Dr ADOLF, Ein Beiträg zur Frage der Zuckerstörung im Tierkörper durch Fermentwirkung (Glykolyse). (*Hoppe-Seyler's Zeitschrift*, XL, 1903, s. 220-233.)

1903. BLUMENTHAL, F., Ueber das glykolytische Ferment. (*Deutsche med. Wochenschrift*, 1903, 51, s. 961.)

1903. HIRSCH, R., Ueber die glykolytische Wirkung der Leber. (*Hofmeisters Beiträge*, IV, 1903, s. 535.)

1903. CONHEIM, O., Die Kohlehydratverbrennung in den Muskeln und ihre Beeinflussung durch das Pankreas. (*Zeitschrift für physiologische Chemie*, XXXIX, p. 336.)

1903. FEINSCHMIDT, J., Ueber das zuckerstörende Ferment in den Organen. (*Hofmeisters Beiträge*, IV, 1903, s. 511.)

1903. SIMACEK, Dr EUGEN, Ueber die Isolierung der hydrolytischen Enzyme aus dem Pankreas und sein glykolytisches Vermögen. (*Centralblatt für Physiologie*, XVII, 1903, s. 209-217.)

1903. SIMACEK, Dr EUGEN, Ein Beitrag zu Conheims « kohlehydrateverbreunung in den Muskeln und ihre Beeinflussung durch das Pankreas »; zugleich eine Gegenkritik. (*Centralblatt für Physiologie*, 1903, XVII, s. 477-485.)

1903. BATELLI, La prétendue fermentation alcoolique des tissus animaux. (*Comptes rendus Académie des Sciences*, 1903, 137, p. 1079-1086.)

1904. STOKLASA, Dr JULIUS, Die glykolytischen Enzyme im tierischen Gewebe. (*Deutsche med. Wochenschrift*, 1904, s. 198.)

1904. STOKLASA, Dr JULIUS, Alkoholische Gärung im Tierorganismus und die Isolierung gärungserregender Enzyme aus Tiergeweben. (Unter Mitwirkung von Cerny, Jelinek, Simacek, Viteke.) ((*Pflügers Archiv.*, Bd 101, H. 7 und. 8, s. 311.)

Quelques faits et quelques expériences concernant la rage

Par MM. Ch. NICOLLE, Directeur de l'Institut Pasteur de Tunis,

et J. CHALTIEL, Préparateur du service antirabique.

I

La rage chez la mangouste ichneumon (*Herpestes ichneumon*).

La mangouste ichneumon, appelée improprement *raton*, est un petit carnassier très commun de l'Afrique du Nord, auquel les Égyptiens avaient fait une réputation imméritée. Loin de s'attaquer au crocodile ainsi que le veut la légende et comme Et. Geoffroy Saint-Hilaire l'affirmait, le *rat des Pharaons* ne s'en prend qu'aux animaux plus petits et plus faibles que lui, principalement aux oiseaux de basse-cour dont il est un des plus redoutables destructeurs. Jamais il n'attaque l'homme. Jusqu'à présent, aucun auteur ne l'avait cité parmi les animaux susceptibles de contracter et de transmettre la rage.

Le 17 avril 1903, un garde forestier indigène d'Aïn-Draham (Kroumirie) et son fils âgé de 5 ans se présentaient à l'Institut Pasteur pour y suivre le traitement antirabique; ils apportaient avec eux le cadavre de l'animal suspect de rage qui les avait mordus, c'était un raton. L'accident avait eu lieu dans les circonstances suivantes : l'avant-veille au soir, vers 7 heures, la famille était réunie à table pour le repas, quand tout à coup, par la porte restée ouverte, le raton était entré, s'était brusquement précipité sur l'enfant qui lui tournait le dos et l'avait mordu à la nuque, le père avait aussitôt saisi et étranglé l'animal, non sans avoir essuyé une morsure à la main.

Une émulsion du bulbe de la mangouste fut inoculée dans la chambre antérieure de l'œil de deux lapins ; ceux-ci contractèrent la rage et moururent au bout de 10 et 11 jours; des passages prouvèrent qu'il s'agissait bien de rage légitime. Malgré la virulence renforcée du virus, le traitement antirabique fut suivi de succès chez les deux malades.

Il nous parût intéressant, à la suite de ce fait, de rechercher quelle était l'évolution de la rage expérimentale chez la mangouste. Dans ce but, nous nous procurâmes un animal de cette espèce, lequel fut inoculé dans la chambre antérieure de l'œil, le 1er juillet avec une émulsion de virus fixe, en même temps que les lapins de passage destinés à la préparation du vaccin antirabique. Les premiers symptômes se montrèrent exactement en même temps (8 juillet) chez les lapins et chez la mangouste. La rage, chez elle comme chez eux, revêtit la forme paralytique. Il n'y eut apparence de phénomènes d'excitation qu'au début, l'animal réagissant lorsqu'on le piquait et mordant alors les objets qu'on lui présentait. Le 10 juillet (9e jour), ces phénomènes avaient disparu et la paralysie gagnait les muscles des mâchoires ; il nous fut impossible, ce jour, de faire mordre par le raton un lapin qu'on avait introduit dans sa cage. Les jours suivants, les phénomènes paralytiques se généralisèrent progressivement et l'animal mourut le 12 juillet (11e jour), dans la nuit, en même temps que les lapins de passage.

Deux lapins inoculés dans l'œil le 13 juillet avec une émulsion du bulbe du raton contractèrent la rage le 19 juillet (6e jour) et moururent l'un le 20, l'autre le 23 juillet. Un troisième lapin inoculé dans l'œil le même jour que les précédents avec une émulsion des glandes salivaires de la mangouste mourut le 19 juillet sans avoir présenté de symptômes rabiques nets ; l'inoculation de ses centres nerveux à un autre lapin donna un résultat négatif.

L'observation que nous avons relatée et le résultat de ces expériences nous amenèrent à rechercher s'il n'existait pas, dans la littérature scientifique, de cas analogues au nôtre. Nos recherches furent négatives. M. le professeur Trolard, directeur de l'Institut Pasteur d'Alger, à l'obligeance duquel nous eûmes recours, nous écrivit qu'il n'avait jamais observé de morsures par mangouste chez les malades traités par lui.

Cependant, en compulsant les archives de l'Institut Pasteue de Tunis, nous découvrîmes une observation analogue à la nôtrt et demeurée inédite. Il s'agit d'un indigène algérien, ayant suivi le traitement antirabique du 14 au 31 juillet 1901. Cet

individu avait été mordu aux environs de Bône le 8 juillet par un raton et portait deux plaies, l'une au pouce, l'autre à la face dorsale de la main droite. M. Senac-Pagès, vétérinaire à Bône, qui avait pratiqué l'autopsie de l'animal, concluait à la rage; aucune étude expérimentale ne fut faite dans ce cas.

Un peu plus tard, nous avons eu connaissance de deux autres cas de rage chez la mangouste.

Le 22 janvier 1904, trois Algériens français se présentaient à l'Institut Pasteur de Tunis pour suivre le traitement antirabique; ils avaient été contaminés quelques jours auparavant, à Bône, par la bave d'un chien reconnu enragé à l'examen vétérinaire. Ce chien avait été lui-même mordu 35 jours avant l'apparition des premiers symptômes rabiques par un raton qui lui avait fait des morsures multiples à la tête et aux oreilles; la rage chez ce chien avait revêtu la forme paralytique. L'autopsie du raton ne fut pas pratiquée.

Le dernier fait du même ordre dont nous avons eu connaissance grâce à l'obligeance de MM. Ventre (de Bône) et Boulant, vétérinaire militaire de la même ville, avait été observé en mars 1903 à Héliopolis près Guelma par M. Gauharou, vétérinaire. Ce praticien eut l'occasion de pratiquer l'autopsie d'un raton qui s'était attaqué sans provocation à une femme indigène et l'avait mordue à la face et à la main. Le rapport très détaillé de M. Gauharou, dont nous avons eu la copie entre les mains, concluait nettement à la rage. D'après les renseignements un peu vagues qui nous ont été fournis, la femme mordue aurait succombé à la même maladie.

Ces observations et nos expériences montrent que la mangouste ichneumon est susceptible de contracter la rage et de la transmettre à l'homme ou aux animaux; il y a donc lieu de prendre vis-à-vis des morsures du raton les mêmes précautions que vis-à-vis de celles des chiens errants. Ces précautions sont d'autant plus légitimes que le virus rabique semble augmenter de virulence en passant par l'organisme de la mangouste.

II

(VIRULENCE DES GLANDES *salivaires* chez les lapins inoculés PAR TRÉPANATION avec le virus fixe (LAPINS DE PASSAGE).

Nous avons recherché, par quelques expériences, la virulence des glandes salivaires chez les lapins servant à la préparation du vaccin de la rage (lapins de passage). La question n'a pas une bien grande importance pratique, puisque la rage furieuse n'existe guère chez le lapin et que celui-ci ne figure point parmi les *animaux mordeurs*. Elle n'est cependant pas dépourvue de tout intérêt à ce point de vue, car il peut arriver qu'un employé de laboratoire souille accidentellement ses mains au niveau d'une écorchure avec la bave d'un lapin de passage.

D'autre part, il nous a semblé qu'il y avait là un détail à étudier au point de vue de la répartition de la matière virulente chez les animaux atteints de rage. C'est principalement dans ce but que nous avons institué les expériences dont l'exposé suit :

1re SÉRIE. — Avec une émulsion peu épaisse des trois glandes salivaires d'un lapin de passage (inoculé le 1er avril par trépanation, mort le 9) on inocule sous la dure-mère deux lapins.

Lapin 11. — Inoculé le 9 avril; les symptômes rabiques débutent chez lui le 30 avril (21e jour), mort le 2 mai (23e jour). Un passage pratiqué avec les centres nerveux de ce lapin montre qu'il est bien mort de rage légitime; en effet, le *lapin* 31 inoculé dans l'œil avec une émulsion du cerveau du lapin 11, présente les premiers symptômes rabiques le 20 mai (18e jour) et meurt le 22 (20e jour).

Lapin 60. — Inoculé le même jour — aucun symptôme. — Le 13 juillet (99e jour), ce lapin est réinoculé par trépanation avec une émulsion de virus fixe, il contracte la rage le 20 juillet (7e jour) et meurt le 25 (12e jour), exactement comme les lapins de la série.

(Les lapins de la série inoculés le même jour (9 avril), avec les centres nerveux du lapin de passage dont les glandes salivaires avaient été employées dans les expériences précédentes, sont morts de rage le 20 avril (11e jour, dans les délais ordinaires).

2e SÉRIE. — Le même jour, avec une émulsion peu épaisse des trois glandes salivaires d'un autre lapin du même passage, on inocule dans les mêmes conditions deux lapins.

Lapin 5. — Inoculé le 9 avril, — aucun symptôme. — Le 13 juillet (99e jour), ce lapin est réinoculé avec le même virus fixe et dans les mêmes conditions que le lapin 60, il contracte la rage le 21 juillet (8e jour) et meurt le 25 (12e jour).

Lapin 76. — Inoculé le même jour — aucun symptôme. Ce lapin, réinoculé comme le précédent le 13 juillet (99e jour), est mort des suites du traumatisme opératoire.

3e Série. — Avec une émulsion peu épaisse des trois glandes salivaires d'un lapin de passage (inoculé le 9 avril, mort le 20), on inocule, le 20 avril, sous la dure-mère, deux lapins.

Lapin 10. — Inoculé le 20 avril. — Mort le 10 mai (20e jour) sans avoir présenté de symptômes rabiques nets. — Le même jour, on pratique avec une émulsion de ses centres nerveux, une inoculation dans l'œil du *lapin* 28, celui-ci meurt le 25 mai (13e jour) sans avoir présenté de symptômes rabiques nets. Le *lapin* 94, inoculé le même jour sous la dure-mère avec une émulsion des centres nerveux du lapin 28, n'a présenté dans la suite aucun symptôme rabique; il a été suivi plus de trois mois.

Lapin 12. — Inoculé le même jour — aucun symptôme. — Le 21 juillet (93e jour) ce lapin est réinoculé par trépanation avec une émulsion de virus) fixe, il contracte la rage le 28 juillet (7e jour) et meurt le 3 août (13e jour avec un très léger retard sur les lapins de la série, morts exactement le 11e jour.

(Les lapins de la série inoculés le même jour (20 avril), avec les centres nerveux du lapin de passage dont les glandes salivaires avaient été employées dans les expériences précédentes, sont morts de rage le 30 avril (10e jour) dans les délais ordinaires.)

4e Série. — Avec une émulsion peu épaisse des trois glandes salivaires d'un lapin de passage (inoculé le 29 décembre, mort le 11 janvier), on inocule, le 11 janvier, sous la dure-mère, deux lapins.

Lapin 27. — Inoculé le 11 janvier — aucun symptôme. — Le 16 avril (96e jour) ce lapin est réinoculé par trépanation avec une émulsion de virus fixe, il contracte la rage le 27 avril (11e jour) et meurt le 30 avril (14e jour), avec un très léger retard sur les lapins de la série morts aux 10e et 11e jours.

Lapin 71. — Inoculé le même jour — aucun symptôme. — Le 16 avril (96e jour) ce lapin est réinoculé dans les mêmes conditions et avec le même virus que le lapin 27, il contracte le rage le 22 avril (8e jour) et meurt le 25 (10e jour) exactement dans les mêmes délais que les lapins de la série.

(Les lapins de passage inoculés le même jour, avec les centres nerveux du lapin dont les glandes salivaires avaient servi dans les expériences précédentes, sont morts de rage dans les délais ordinaires.)

5e Série. — Le même jour, avec une émulsion peu épaisse des trois glandes salivaires d'un lapin du même passage, on inocule, dans les mêmes conditions, un autre lapin.

Lapin 13. — Inoculé le 11 janvier, symptômes rabiques débutant le 21 janvier (10e jour), mort le 22 (11e jour) en même temps que les lapins de la série. Un passage, pratiqué avec les centres nerveux de ce lapin, montre qu'il est bien mort de rage légitime; en effet le *lapin* 84 inoculé dans l'œil avec une émulsion du cerveau du lapin 13, contracte la rage le 4 février (10e jour) et meurt le 6 (12e jour).

En résumé, sur *neuf lapins* inoculés par trépanation avec une émulsion de glandes salivaires de lapins de passage :

2 ont contracté la rage, l'un dans les délais normaux, l'autre avec un retard de dix jours sur les lapins de la série ayant reçu sous la dure-mère une émulsion des centres nerveux du même lapin.

6 n'ont présenté aucun symptôme. Dans ce cas, il ne semble pas que l'inoculation de l'émulsion des glandes salivaires ait créé chez eux la plus légère augmentation de résistance vis-à-vis du virus fixe ; en effet, une inoculation d'épreuve, pratiquée avec ce virus a été suivie de l'apparition des symptômes rabiques et de la mort dans un temps qui n'a excédé que deux fois seulement, et de fort peu (1 et 2 jours), les délais ordinaires.

Chez un lapin, le résultat a été douteux (lapin 10).

Il est à noter qu'une même émulsion (série I), inoculée à deux lapins, a déterminé chez l'un l'apparition d'une rage typique, tandis que chez l'autre elle s'est montrée dépourvue de toute activité.

La conclusion à tirer de ces expériences paraît être la suivante : *Les glandes salivaires des lapins de passage ne sont que rarement virulentes* (une fois sur quatre), elles ne contiennent qu'une faible quantité de virus, mais la virulence de celui-ci, lorsqu'il s'y montre, n'y est nullement atténuée.

Pratiquement, il y a lieu de prendre des précautions dans les laboratoires vis-à-vis de la bave des lapins de passage.

III

LA RAGE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE RAT

L'étude de la rage expérimentale chez le rat ne semble pas avoir tenté jusqu'à présent de nombreux auteurs. Le seul document que nous connaissions sur la question est une courte note de M. Remlinger[1], consacrée surtout à l'étude de la rage expérimentale de la souris. Dans cette note, l'auteur se borne à nous apprendre que le rat blanc et le rat tigré (il n'a pas opéré sur le rat gris), se comportent vis-à-vis du virus fixe comme la souris blanche et qu'une inoculation sous-cutanée ou intramusculaire

1. *Société de Biologie*, 9 janvier 1904.

de ce virus leur donne la rage dans un cas sur deux. Cette absence de documents étonne d'abord, car le rat figure comme *animal mordeur* dans les statistiques de quelques Instituts antirabiques (Kharkoff-Constantinople). Elle s'explique cependant facilement par la difficulté de l'expérimentation sur ces animaux, principalement sur le rat gris. Le maniement en est en effet délicat, dangereux même pour l'opérateur; d'autre part, la sensibilité du rat aux anesthésiques (chloroforme surtout) rend l'emploi de ceux-ci pratiquement impossible.

Plus heureux que nos devanciers, nous avons pu pratiquer quelques expériences sur ces animaux. Les raisons que nous venons d'indiquer expliquent le petit nombre de celles qui ont eu le rat gris pour objet.

Nous avons perdu d'ailleurs la plupart des animaux de cette espèce, du fait de l'anesthésie ou des suites du traumatime opératoire, lorsque nous avons cherché à pratiquer chez eux l'inoculation intracranienne sans anesthésie, ce qui est cependant le seul procédé pratique.

Voici le résumé de nos expériences :

INOCULATION DE VIRUS FIXE.

1° Au rat gris. — *Rat* 7. — Inoculé le 16 mars 1903, *dans la chambre antérieure de l'œil*, avec une goutte d'une émulsion épaisse de virus fixe provenant d'un lapin de passage mort le même jour. Premiers symptômes rabiques le 26 (10e jour), paralysie du train postérieur à marche rapide, aucun phémomène d'excitation, l'animal mord seulement quand on le pique; le soir du même jour la paralysie est presque complète et l'animal meurt le 27 au matin (11e jour).

Ce même jour, avec les centres nerveux du rat qui vient de mourir, on inocule dans la chambre antérieure de l'œil un *lapin* n° 64 et un *rat* n° 9. Le lapin meurt le 4 avril (8e jour), après avoir présenté depuis le matin les symptômes rabiques les plus nets. Le rat présente les premiers symptômes de la rage dès le 1er avril (5e jour) et meurt le 2 (6e jour). Un *rat* n° 10 inoculé dans l'œil, le même jour, avec les centres nerveux du rat 9, contracte la rage le 16 avril (14e jour) et meurt le lendemain (15e jour).

Nous avons recherché qu'elle était la virulence des glandes salivaires du rat 7. Une goutte d'une émulsion d'un mélange des trois glandes, inoculée dans la chambre antérieure de l'œil du *lapin* 41 le 27 mars, a déterminé chez lui l'apparition d'une rage typique avec mort le 7 avril (11e jour); d'autre part un *rat* n° 8, inoculé dans les mêmes conditions, est demeuré indemne de rage.

Rat 5. — Inoculé le 14 mars 1903, *dans la chambre antérieure de l'œil*, avec une goutte d'une émulsion épaisse de virus fixe provenant d'un lapin de passage mort le même jour. Ce rat est trouvé mort le 26 mars (12e jour) sans avoir présenté aucun symptôme rabique net. Un lapin inoculé avec les centrés nerveux de ce rat est mort des suites du tranmatisme opératoire.

Rat 6. — Inoculé le 14 mars, *dans les muscles* de la cuisse, avec le même virus que le rat 5, n'a présenté ultérieurement aucun symptôme rabique.

2o Au rat blanc. — *Rat* 1. — Inoculé le 12 janvier 1904, *sous la dure-mère*, avec une goutte d'émulsion épaisse de virus fixe provenant d'un lapin de passage. Ce rat est trouvé mort le 19 janvier au matin (7e jour), sans avoir présenté le moindre symptôme rabique. (Il est à noter que la cage renfermant le rat avait été laissée en plein air et que la nuit du 18 au 19 janvier a été exceptionnellemont froide : + 3o.

Le *lapin* 45 inoculé dans l'œil le 19 janvier avec une émulsion des centres nerveux du rat 1, a contracté la rage le 27 janvier (8e jour) et est mort le 30 (11e jour).

Rat 2. — Inoculé le même jour et avec le même produit que le rat 1, mais l'inoculation ayant été faite *dans la chambre antérieure de l'œil*. Les premiers symptômes rabiques ont apparu chez ce rat le 19 (7e jour), ils se sont caractérisés par une parésie du train postérieur, avec quelques phénomènes d'excitation et de la tendance à mordre. Les jours suivants la paralysie est devenue plus étendue et plus complète, les phénomènes d'excitation ont cessé; l'animal est mort le 22 juin. Le *lapin* 96, inoculé ce jour sous la duremère, avec une émulsion d'un mélange des glandes salivaires du rat 2, n'a présenté ultérieurement aucun symptôme : réinoculé par trépanation avec un virus de passage le 29 avril, il a contracté la rage sous la forme classique et est mort le 7 mai (8e jour).

Rat 3. — Inoculé le même jour que le rat 2 avec le même produit et comme lui *dans la chambre antérieure de l'œil*. Les premiers symptômes ont apparu le 20 janvier (8e jour). l'évolution a été identique à celle décrite pour le rat 2, mort le 22 (10e jour), Le *lapin* 56, inoculé ce jour sous la dure-mère avec une émulsion des centres nerveux du rat 3, a contracté la rage le 28 janvier 6e jour) et est mort le 30 (8e jour). Le *lapin* 2, inoculé dans la chambre antérieure de l'œil avec une émulsion d'un mélange des glandes salivaires du rat 3, a contracté la rage le 14 février (23e jour) et est mort le 17 (26e jour).

Rat 4. — Inoculé *dans les muscles* le même jour et avec le même produit que les rats 2 et 3 il n'a présenté aucun symptôme. Réinoculé avec une émulsion de virus fixe sous la dure-mère le 22 avril, il a contracté la rage le 28 (6e jour) et est mort le 1er mai (9e jour).

Rat 11. — Inoculé *dans les muscles* comme le précédent. Aucun symptôme: mort le 21 janvier (9e jour). Aucun passage n'a été pratiqué avec les centres nerveux de cet animal.

INOCULATIONS DE VIRUS DES RUES.

Les expériences qui suivent ont été pratiquées avec les centres nerveux d'un chien mort de rage spontanée le 13 janvier au matin. Le *lapin* 1, inoculé dans la chambre antérieure de l'œil, a contracté la rage le 28 janvier

(15e jour) et est mort le 30 (17e jour). Avec le même produit, le même jour, on inocule trois rats blancs :

Rat 12. — Inoculé *sous la dure-mère.* N'a présenté aucun symptôme. Mort dans la nuit du 24 au 25 janvier (12e jour). Le *lapin* 34, inoculé ce jour dans la chambre antérieure de l'œil avec une émulsion des centres nerveux du rat 12, a contracté la rage le 6 février (12e jour) et est mort le 7 (13e jour).

Rat 13. — Inoculé *dans la chambre antérieure de l'œil.* N'a présenté aucun symptôme. Mort le 9 février (15e jour). Un passage pratiqué sur le *lapin* 54 n'a donné aucun résultat, cet animal étant mort accidentellement le lendemain de l'inoculation.

Rat. 14 — Inoculé *dans les muscles* de la cuisse. Aucun symptôme, encore vivant en juin.

En résumé, dans ces expériences, *la totalité des rats gris* (4) *ou blancs* (3), *inoculés sous la dure-mère* (1) *ou dans la chambre antérieure de l'œil* (6), *avec une émulsion de virus fixe, a contracté la rage ;* il en a été *de même des rats blancs* (2) *inoculés semblablement avec un virus des rues. L'inoculation intramusculaire de ces mêmes virus ne nous a donné que des résultats négatifs,* sauf cependant dans un cas (rat 11) douteux.

Les centres nerveux des rats ayant succombé à la rage se sont montrés, d'une façon constante, virulents et souvent même doués d'une virulence exaltée pour le lapin et pour le rat; dans un cas, nous avons pu réaliser trois passages successifs par cet animal.

Les glandes salivaires du rat atteint de rage sont souvent virulentes pour le lapin (2 fois sur 3).

Le rat (gris ou blanc) est donc un animal parfaitement sensible à la rage et susceptible, dans des cas évidemment très rares, de communiquer cette maladie à l'homme ou aux animaux.

Malgré sa sensibilité au virus rabique, le rat ne sera que bien rarement choisi comme animal d'étude de la rage. La difficulté de l'expérimentation sur lui est un premier obstacle. D'autre part, l'évolution de la rage chez le rat est souvent si rapide, qu'il est impossible de reconnaître la nature de l'infection à laquelle succombe l'animal inoculé. Sur un total de neuf rats [1] ayant

1. Nous ne comptons pas dans ce total le rat 11, mort également sans symptômes, parce qu'il nous manque la preuve absolue qu'il ait succombé à la rage.

contracté la rage dans nos expériences, quatre sont morts sans avoir présenté le moindre symptôme, et des passages ont été nécessaires pour démontrer que leur mort était bien due à l'inoculation du virus.

Statistique des personnes traitées à l'Institut Pasteur de Tunis
PENDANT L'ANNÉE 1903

Par M. CH. NICOLLE

Directeur de l'Institut Pasteur de Tunis.

Du 1er janvier, date de notre entrée en fonctions, au 31 décembre 1903, 284 personnes ont suivi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur. De ce chiffre, on doit retrancher 5 personnes ayant interrompu le traitement au bout de quelques jours pour causes diverses et 5 autres appartenant au personnel de l'Institut, ces dernières ayant subi des inoculations préventives sans morsure antérieure. Restent donc *274 personnes traitées. La mortalité a été nulle.*

On peut ainsi classer les cas : morsures à la tête : 22; aux mains : 137; au tronc et aux membres : 115. L'existence de la rage chez l'animal mordeur a été reconnue expérimentalement dans 38 cas; 110 fois elle l'a été par un examen vétérinaire; dans 126 cas l'animal était suspect de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens 242, chats 11, bovidés 8, ânes 5, mules 3, chacals 3, mangoustes 2. C'est la première fois, croyons-nous, que la mangouste figure dans une statistique parmi les animaux mordeurs; ce fait nous a paru assez intéressant pour faire l'objet de la note précédente.

Sur les 274 personnes traitées, 170 avaient leur domicile en Tunisie (Français 70, Italiens 3, Grec 1, Maltais 6, Israélites 2, Arabes 65), 104 venaient d'Algérie. (Province de Constantine.) Une des personnes domiciliées en Tunisie avait été mordue à Lyon.

La méthode employée à l'Institut Pasteur de Tunis pour le traitement préventif de la rage consiste dans l'emploi de moelles glycérinées (procédé de M. Calmette). Dans les cas ordinaires, la succession des moelles est la suivante : 1er jour, moelle de

13 jours le matin, de 11 le soir; 2e jour, moelle de 9-10 le matin, de 7-8 le soir; 3e jour moelle de 6 jours, puis les jours, suivants successivement moelles de 5, 5, 4, 3, 5, 5, 4, 4, 3, 3, 5, 5, 4, 4, 3, 3 jours. Soit 21 inoculations en 19 jours. La quantité d'émulsion inoculée est de 6 centimètres cubes jusqu'à la moelle de 6 jours, puis 4 centimètres cubes. En cas de morsure particulièrement grave ou de retard très grand dans le traitement, nous opérons ainsi : 1er, 2e et 4e jours comme ci-dessus, avec cette différence que la dose d'émulsion inoculée est portée à 10 centimètres cubes; puis les jours suivants, successivement moelles de 3, 5, 5, 4, 3, 2, 5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 5, 5, 4, 4, 3, 2 jours (4 centimètres cubes d'émulsion); soit 22 jours de traitement et 24 inoculations dont trois de moelle de 2 jours. On notera que pour ce traitement intensif, nous passons au début, de la moelle de 6 à celle de 3 jours

*
* *

La dernière statistique des résultats du traitement antirabique publiée par l'Institut Pasteur de Tunis[1] s'arrêtait au 15 juin 1901. De cette date au 1er janvier 1903, le service antirabique dirigé par MM. Ducloux et Allemand-Martin a eu à soigner 349 personnes, desquelles il faut en retrancher 9 pour causes diverses. Restent 340 traités. Il y a eu 2 décès, dont un chez un indigène ayant succombé le 8e jour après la fin du traitement. Suivant les règles habituelles, ce décès ne doit pas être retenu, l'immunité n'étant acquise que 15 jours après la dernière inoculation. La mortalité rectifiée a donc été d'une personne sur 339, soit 0, 29 0/0.

Les cas traités peuvent se répartir ainsi : morsures à la tête 19 ; aux mains 158; au tronc et aux membres : 162. L'existence de la rage a été démontrée expérimentalement dans 22 cas, par un examen vétérinaire 139 fois; dans 178 cas, l'animal était suspect de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens 224, chats 11, bovidés 2, ânes 6, mangouste 1.

Sus 339 personnes traitées, 266 avaient leur domicile en Tunisie, 73 venaient d'Algérie.

Depuis la publication de la dernière statistique de l'Institut Pasteur de Tunis, un décès par rage s'est produit chez une

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 mai 1902. Pages 386 et suivantes.

des personnes portées comme guéries; les chiffres publiés doivent donc être ainsi rectifiés: 827 traités, 4 décès, mortalité : 0,44 0/0.

Au total, depuis sa création jusqu'au 31 décembre 1903, l'Institut Pasteur a soigné 1.440 personnes, 5 seulement ont contracté la rage ; soit une mortalité de 0, 34 0/0.

OBSERVATIONS DES PERSONNES AYANT CONTRACTÉ LA RAGE

Année 1901. — Belkassem ben Ali Abrouk, indigène musulman, 8 ans, de Mokenine, caïdat de Monastir, contrôle civil de Sousse, mordu le 17 avril au mollet gauche par un chien errant, trois morsures. Traité à l'Institut Pasteur du 29 avril au 19 mai. Décédé vers le 20 juin d'une affection qui semble être la rage. Il n'y as pas eu d'examen médical du malade.

Année 1902. — Mohamed ben Hassin el Amari, indigène musulman, 7 ans, de Mahdia, mordu le 24 janvier au poignet et à la fesse gauches, plaies pénétrantes. Le chien mordeur a été examiné par un médecin qui a porté le diagnostic de rage. Aucun soin local. Traité à l'Institut Pasteur du 29 janvier au 21 février ; décédé le 12 avril, d'une affection qui semble être la rage, mais au sujet de laquelle aucun détail n'a été donné à l'Institut Pasteur.

Le même chien aurait mordu deux chiens, un chat, un chameau et quatre personnes, dont une a suivi le traitement avec succès (aucun renseignement n'a été fourni sur les trois autres).

Le gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

18me ANNÉE NOVEMBRE 1904 N° 11

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Etudes expérimentales sur la Syphilis

PAR EL. METCHNIKOFF ET EM. ROUX

(TROISIÈME MÉMOIRE)

(Avec les planches V et VI).

I

LA SYPHILIS DU CHIMPANZÉ.

Après avoir établi que les chimpanzés sont sensibles à la syphilis (premier mémoire) et après avoir signalé que les accidents syphilitiques de ces anthropoïdes varient selon l'origine de la substance inoculée (deuxième mémoire), nous nous sommes mis à étudier les propriétés du virus syphilitique sous l'influence de divers facteurs. Une partie des résultats que nous résumons dans ce mémoire ont été communiqués par l'un de nous, à Berlin, en septembre dernier, au Congrès international de dermatologie.

La base fondamentale de nos études, c'est-à-dire la syphilis expérimentale des singes anthropoïdes, n'a plus besoin de preuves nouvelles. Après nos publications sur l'inoculabilité de la syphilis humaine au chimpanzé et sur la possibilité d'entretenir par passage le virus syphilitique chez ces anthropoïdes, M. Lassar[1] a obtenu la syphilis expérimentale sur un premier chimpanzé, inoculé avec du virus d'un chancre induré humain, et ensuite[2] chez un second chimpanzé, inoculé avec du virus syphilitique du premier.

1. *Berliner klin. Wochenschr.* 1903, p. 1189.
2. *Ibid.*, 1904, p. 801.

Plus tard M. A. Neisser[1] a rapporté les résultats des inoculations du virus syphilitique à plusieurs chimpanzés, dont quelques uns ont manifesté des accidents primaires et secondaires des plus typiques. Il a en outre inoculé plusieurs orangs-outangs et un gibbon qui se montrèrent sensibles à la syphilis mais à un moindre degré que les chimpanzés.

En tout, nous avons inoculé jusqu'à présent, dix chimpanzés avec du virus syphilitique de diverses provenances et nous avons obtenu dix résultats positifs. Comme les deux expériences de M. Lassar ont été aussi couronnées de succès, il s'ensuit que douze chimpanzés inoculés ont tous pris la syphilis. Il est donc certain que cette maladie est inoculable à coup sûr aux chimpanzés, ce qui constitue un fait important pour l'étude expérimentale de la syphilis.

Sur les dix chimpanzés de nos expériences, sept ont été inoculés avec du virus humain de diverses origines. Tous ont reçu de la sérosité des chancres indurés de plusieurs individus et quatre ont été inoculés en outre avec le produit d'accidents secondaires : plaque muqueuse et syphilide chancriforme.

Un chimpanzé a été inoculé avec les exsudats du chancre et d'une syphilide papuleuse d'un autre anthropoïde. Un autre chimpanzé a reçu la sérosité de l'accident primaire d'un macaque bonnet chinois (Macacus sinicus), et un autre a été inoculé avec le produit d'un chancre du macaque de Buffon (Macacus cynomolgus). Les virus de toutes ces origines sont, comme nous l'avons déjà dit, inoculables aux chimpanzés.

L'inoculation se faisait presque toujours avec le scarificateur Vidal et consistait en petites scarifications nombreuses très superficielles, pratiquées aux arcades sourcilières, aux paupières et aux organes génitaux : clitoris, capuchon clitoridien, prépuce et verge. Dans quelques expériences, nous injections en outre, avec une seringue, du virus syphilitique sous la peau des cuisses. L'incubation de la syphilis d'origine humaine a varié entre 22 et 37 jours. Elle a été dans nos sept cas de 22, 22, 26, 33, 35 et 37 jours.

L'accident primaire débutait sous forme d'une petite tache à peine plus rose que les parties environnantes et faisant une saillie très légère (fig. 1). Quelquefois ces caractères étaient si

1. *Deutsche, médic. Wochenschr.*, 1904, p. 1369 et 1431.

peu prononcés au début que l'on pouvait hésiter sur leur signification, et ce n'est que plus tard que leur nature syphilitique s'accusait d'une façon indiscutable. Les taches rondes ou ovales ne tranchaient jamais brusquement sur les parties voisines, mais se confondaient avec elles graduellement.

Deux fois seulement nous avons vu apparaître au milieu des taches roses de petites vésicules fermées et remplies de liquide. C'était d'abord sur le prépuce clitoridien de notre premier sujet d'expérience, où la vésicule initiale était transparente; et, ensuite, sur la paupière supérieure d'un autre chimpanzé (fig. 3) où les deux petites taches roses du début se sont présentées le lendemain, couvertes de deux vésicules opalines, grisâtres, non transparentes (fig. 4). Bientôt après leur apparition, les vésicules s'aplatissaient et se transformaient en croûtes; d'abord très petites, celles-ci grandissaient progressivement.

Sauf ces deux cas exceptionnels, les vésicules ne se développaient jamais. Les petites taches roses présentaient, le lendemain ou plusieurs jours après leur apparition, de toutes petites squames dans leur partie centrale. Ces squames, d'abord sèches, se transformaient plus tard en croûtes jaunes ou brunâtres qui devenaient de plus en plus grosses, se fendaient et laissaient souvent suinter une sérosité claire. Au bout d'un nombre variable de jours, les lésions décrites se transformaient en chancres indurés très caractéristiques (fig. 2, 5). Leurs bords étaient saillants et le fond, après la chute de la croûte, se présentait sous forme d'une ulcération humide avec une surface pâle, lardacée. Ces chancres qui étaient le plus souvent multiples et se développaient parfois sur des portes d'entrée du virus très éloignées les unes des autres, telles que l'arcade sourcilière, les paupières et la cuisse, se maintenaient pendant des semaines et des mois. Leur guérison se faisait lentement et durait un nombre variable de jours.

Quelques jours après l'apparition de la lésion primaire, les ganglions lymphatiques de la région voisine s'hypertrophiaient. On sentait, à la palpation, un ou plusieurs ganglions durs, facilement mobiles et indolores à la palpation.

On voit bien, d'après cette description, que l'accident primaire chez le chimpanzé correspond sous tous les rapports à

celui de l'homme. Cet accident est suivi de manifestations secondaires, également comparables à celles de l'homme. Nous avons déjà décrit, dans un de nos mémoires, les syphilides papulo-squameuses qui s'étaient développées sur diverses parties du corps de notre premier chimpanzé syphilitique.

M. Lassar a observé des papules semblables sur la tête, les bras et surtout sur la plante des mains et des pieds de ses deux chimpanzés inoculés. Développées environ un mois après le début du chancre, ces syphilides présentaient tous les caractères typiques des lésions analogues chez l'homme. La nature syphilitique de cette affection cutanée était bien évidente d'elle-même; mais, pour lever toute hésitation, nous avons inoculé un peu du raclage d'une syphilide papuleuse de notre premier chimpanzé à un second individu du même genre. Ainsi que nous l'avons déjà rapporté dans un de nos mémoires, le résultat de cette expérience a été positif.

Depuis, nous avons observé des accidents secondaires chez deux autres de nos chimpanzés. Dix-huit jours après le début du chancre de l'arcade sourcilière, chez l'un d'eux se son montrées sur la surface de la langue deux petites érosions superficielles avec des contours très marqués. Elles ont été suivies, deux jours plus tard, par l'apparition de deux nouvelles érosions analogues, plus rouges que le reste de la langue. Ces plaques se distinguaient par leur persistance et quelques-unes pouvaient être observées encore plus de six semaines après leur apparition. Environ 40 jours après le début des accidents secondaires, il est apparu sur la pointe de la langue deux nouvelles plaques muqueuses rouges avec un bord pâle et un peu relevé, très caractéristiques. Un peu plus tard se développa une plaque muqueuse des plus typiques sur la lèvre inférieure. (fig. 10) Chez un autre chimpanzé, des papules syphilitiques, au nombre de quatre, ont apparu à la face, 29 jours après le début de l'accident primaire et 66 jours après l'inoculation du virus. Ces papules guérirent environ deux semaines plus tard, ayant laissé des cicatrices blanches très marquées.

La nature syphilitique de ces lésions peut être d'autant moins mises en doute que l'inoculation du raclage d'une des premières érosions de la langue, faite à l'arcade sourcilière de

deux macaques (Macacus sinicus et M. cynomolgus) a été suivie d'accidents primaires très caractéristiques.

L'étude histologique des lésions syphilitiques des chimpanzés, faite d'abord avec le matériel de M. Lassar par MM. Becker et Mayer [1], et ensuite par MM. Arnal et Salmon [2], sur des pièces provenant de nos animaux, a démontré une analogie très grande avec la syphilis humaine. Dans les cas où ces lésions n'étaient pas modifiées par des infections surajoutées, elles étaient constituées par une grande accumulation d'éléments mononucléés et par une périartérite caractéristique.

Chez quelques-uns de nos chimpanzés syphilitiques, la rate se trouvait augmentée pendant la période secondaire et se maintenait à cet état pendant longtemps. Par contre, nous n'avons pu constater d'autres lésions d'organes. Chez le chimpanzé atteint d'érosions muqueuses de la langue et de la lèvre, nous avons observé une paraplégie qui s'est maintenue pendant plus d'un mois. Peut-être faut-il l'attribuer à l'infection syphilitique généralisée.

II

VIRUS SYPHILITIQUE FILTRÉ

Les faits que nous venons de résumer suffisent pour donner une idée générale de la syphilis expérimentale des chimpanzés. Après les avoir constatés il était important d'établir les propriétés du virus syphilitique, si pathogène pour ces anthropoïdes.

Les recherches microscopiques que nous avons entreprises ne nous ont pas donné de résultat satisfaisant. L'examen minutieux de la sérosité retirée des vésicules initiales que nous avons décrites plus haut, nous a révélé la présence d'amas leucocytaires, ainsi que d'un certain nombre de globules rouges, mais ne nous a permis de distinguer aucun microbe. Les granulations minuscules du liquide — évidemment quelques débris cellulaires — n'ont pas accusé de mouvements que l'on pût attribuer au choc produit par le voisinage de microbes mobiles. Si les parasites de la syphilis étaient des spirilles beaucoup plus

1. *Berliner Klin. Woch.*, 1993, p. 1192.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904

petits que ceux d'Obermeier ou de la spirillose brésilienne des oiseaux, on aurait pu constater leur présence par les mouvements des corpuscules, suspendus dans la sérosité syphilitique. L'absence de ces mouvements fait plutôt supposer qu'il s'agit dans la syphilis d'un microbe immobile. L'addition, à la sérosité, de rouge neutre, qui fait si bien apparaître les spirilles des oiseaux, n'aboutit à aucun résultat dans la recherche du microbe syphilitique.

On pourrait donc supposer qu'il s'agit ici d'un de ces microbes invisibles dont on est amené à admettre l'existence dans certaines maladies infectieuses, telles que la fièvre aphteuse ou la fièvre jaune. L'expérience récente de MM. Klingmüller et Baermann[1] plaide cependant contre cette supposition. Ces chercheurs se sont inoculé des produits syphilitiques humains, triturés avec de l'eau physiologique et filtrés à travers une bougie Berkefeld. Le résultat de plusieurs inoculations successives a été absolument négatif, d'où les auteurs ont conclu que le virus syphilitique était retenu par le filtre. Contre cette conclusion, on pourrait soulever l'objection que l'expérience a été exécutée sans contrôle. Il manquait un témoin pour prouver que le virus, traité par le procédé de Klingmüller et Baermann, mais non filtré, était bien capable de donner la syphilis. Le délai de plusieurs heures, nécessaire pour obtenir le liquide filtré, et l'eau dite physiologique qui servait pour la dilution, étaient peut-être déjà capables d'altérer la virulence. Comme il est inadmissible de se servir d'un être humain comme sujet de contrôle, on conçoit bien la supériorité des expériences, exécutées sur des anthropoïdes. Assurément moins héroïques, elles sont cependant plus concluantes et plus précises que celles que l'on fait sur l'homme.

Nous avons donc prélevé du virus sur les chancres indurés de la verge de deux hommes syphilitiques et sur deux syphilides chancriformes d'une femme et nous l'avons dilué avec 2 c. c. d'humeur aqueuse de mouton, retirée aussitôt après l'abattage. Après la filtration de ce mélange à travers une bougie Berkefeld 12 A, nous avons inoculé un peu de ce liquide filtré à l'arcade sourcilière et à la cuisse d'un chimpanzé neuf, à l'aide du scarificateur de Vidal. Cette inoculation très superficielle n'a

1. *Deutsche medic. Wochenschr.*, 1904, p. 766.

demandé que quelques gouttes de liquide. Le reste, c'est-à-dire de beaucoup la plus grande partie du mélange filtré, a été aussitôt après inoculé sous la peau de la cuisse du même animal. Toute l'opération, à partir du prélèvement du virus jusqu'à l'inoculation, n'a duré que 50 minutes. Le filtre employé pour cette expérience a été d'avance bien éprouvé par M. Dujardin-Beaumetz, qui a établi qu'il laisse passer le microbe de la péripneumonie des bovidés sans permettre le passage des bactéries, telles que vibrions des eaux et vibrions du choléra.

L'inoculation du virus filtré n'a donné lieu à aucun accident pathologique et n'a pas provoqué la moindre lésion syphilitique ou autre. Pour s'assurer que ce résultat négatif ne pouvait être attribué à l'altération du virus par l'humeur aqueuse du mouton ou par le temps nécessaire à la filtration du liquide, nous avons exécuté une expérience de contrôle sur un autre chimpanzé qui avait reçu les mêmes virus avec la même humeur aqueuse et aux mêmes endroits que le premier. La seule différence consistait en ceci que le chimpanzé de contrôle avait reçu le même mélange non filtré. Eh bien, le 37e jour après l'inoculation, à l'arcade sourcilière de ce chimpanzé apparurent trois taches rondes et saillantes qui ne tardèrent pas à se transformer en trois chancres indurés des plus caractéristiques. Bientôt après, on a pu constater la tuméfaction du ganglion lymphatique au-dessous de l'angle de la mâchoire inférieure du même côté que les chancres. Peu de jours après se développèrent sur la peau de la cuisse inoculée deux chancres indurées des plus typiques.

La conclusion de cette expérience, exécutée d'une façon aussi précise que possible, est donc conforme au résultat de Klingmüller et Baermann : le virus syphilitique ne traverse pas la bougie Berkefeld qui laisse cependant passer le virus de la péripneumonie des bovidés.

III

VIRUS TRAITÉS PAR LA CHALEUR ET LA GLYCÉRINE

La filtration n'est évidemment pas le seul moyen capable d'enlever sa virulence au virus syphilitique. Comme les virus sont en général sensibles à l'action de températures plus ou moins élevées, il était tout naturel de se demander à quel

degré doit être chauffé le virus de la syphilis, pour être dépourvu de toute action pathogène. De nos expériences destinées à résoudre cette question, nous ne citerons que celle où nous nous sommes servis du virus syphilitique humain, mélangé avec de l'humeur aqueuse de mouton. Deux c. c. du mélange ayant servi à l'inoculation du chimpanzé témoin de l'expérience sur la filtration, ont été introduits dans un tube scellé et chauffés pendant une heure à 51°. Aussitôt après, quelques gouttes de ce liquide ont été inoculées par scarification à l'arcade sourcilière, à la paupière et à la cuisse d'un chimpanzé neuf, tandis que le reste, c'est-à-dire de beaucoup la plus grande partie, à été injecté sous la peau de la cuisse du même animal.

Le résultat a été absolument négatif, ce qui prouve que le chauffage prolongé pendant une heure à 51° suffit déjà pour dépouiller le virus syphilitique de toute sa virulence.

Le peu de résistance du virus syphilitique à la chaleur permet de supposer qu'il est également très sensible à l'action des substances chimiques. Pour résoudre cette question, nous nous sommes servi de virus syphilitique, mélangé à de la glycérine. Quelques gouttes de virus, provenant d'un chancre syphilitique de la verge d'un homme atteint de onze chancres simultanés, ont été mélangées *in vitro* avec plusieurs volumes de glycérine concentrée. Ce mélange a été aussitôt inoculé avec le scarificateur à l'arcade sourcilière, à la paupière supérieure et à la vulve d'une jeune chimpanzé. Comme d'habitude, les petites plaies, produites par l'instrument, ont été guéries en peu de temps. Mais 33 jours après l'inoculation, trois lésions tout à fait insignifiantes apparurent à l'arcade sourcilière qui, quelques jours plus tard, se transformèrent en trois chancres indurés des plus typiques. Dans une autre expérience semblable, le virus du chancre induré d'homme, mélangé avec de la glycérine, a provoqué chez un chimpanzé, 35 jours après l'inoculation, un accident secondaire des plus typiques. La conclusion n'est donc pas douteuse : la glycérine ajoutée dans les conditions que nous venons de dire, au virus syphilitique, ne lui enlève pas son pouvoir pathogène.

Les matières infectieuses, dépouillées de leur virulence, étant souvent capables de préserver l'organisme contre la maladie correspondante, il était tout naturel de se demander si le

virus syphilitique, après passage par le filtre ou bien après chauffage à 51°, ne pouvait pas être transformé en vaccin. Dans ce but, nous avons soumis nos deux chimpanzés mentionnés plus haut à une inoculation d'épreuve. Celui qui avait été traité avec du virus filtré a été, trois semaines après cette expérience, inoculé à l'arcade sourcilière et à la paupière supérieure avec un peu de virus, provenant d'un chancre syphilitique induré de la verge d'un homme, datant seulement de 5 jours et non accompagné d'adénopathie. Aussitôt après, le même anthropoïde reçut avec le scarificateur, à la peau de la cuisse, du virus, prélevé sur un chancre d'un autre individu atteint de syphilis.

Vingt-deux jours après cet essai, nous avons remarqué à l'arcade sourcilière, inoculée avec du virus non filtré, un petit point rose légèrement proéminent. En même temps, la partie de la cuisse, soumise à l'action du virus d'épreuve, est devenue rose, sans cependant faire la moindre saillie, ni accuser la moindre induration. Les jours suivants, la nature syphilitique des deux lésions ne fit aucun doute : le point rose de l'arcade sourcilière, auquel s'est bientôt ajouté un second point semblable, se transforma en chancre induré, recouvert d'une croûte épaisse. En même temps, la région rose de la cuisse se transforma en 6 petits chancres indurés qui ne tardèrent pas à confluer en un seul gros chancre très induré. Les ganglions de la région maxillaire et de l'aine correspondantes aux chancres se tuméfièrent d'une façon considérable.

Le second chimpanzé, soumis d'abord à l'action du virus chauffé à 51°, a été, 21 jours plus tard, inoculé à l'arcade sourcilière, à la paupière supérieure, à la cuisse et à la verge, avec du virus syphilitique humain de même origine que celui du chimpanzé dont nous venons de relater l'histoire. Trente-trois jours après cette inoculation d'épreuve, la paupière supérieure nous fit apercevoir deux petites taches à peine plus roses que leur entourage. Ces taches, d'abord à peine distinctes, se transformèrent peu de jours plus tard en deux chancres indurés des plus typiques, qui furent bientôt suivis d'adénopathie de la région maxillaire correspondante.

Les deux expériences que nous venons de décrire imposent la conclusion que le virus syphilitique filtré, aussi bien que ce

virus chauffé à 51°, dans les conditions que nous avons précisées, sont incapables de vacciner l'organisme contre l'accident primaire. Peut-être les virus dépourvus de toute action pathogène et incapables de provoquer la moindre lésion locale sont-ils en général impropres à conférer l'immunité anti syphilitique.

Quelques faits que nous avons pu observer plaident en faveur de cette supposition. Un de nos chimpanzés a été d'abord inoculé avec du virus provenant d'un macaque (Macacus cynomolgus). La quantité de virus prélevée était très petite et le virus était mélangé avec du sang. Le résultat de cette inoculation a été absolument nul, de sorte que, 48 jours après, le même chimpanzé fut de nouveau inoculé avec du virus d'un autre macaque de même espèce. Cette fois-ci, la quantité de virus était plus abondante et l'inoculation, faite dans des endroits non touchés par la première expérience, fut suivie 49 jours plus tard du développement d'un chancre ecthymateux à l'arcade sourcilière et d'un autre à la paupière supérieure. La nature syphilitique de ces lésions était d'autant moins douteuse qu'elles furent bientôt suivies d'une forte hypertrophie de deux ganglions rétromaxillaires du côté correspondant. Ces ganglions étaient mobiles et indolores et ont fourni un liquide qui provoqua chez trois macaques (Macacus cynomolgus) des accidents primaires très nets.

Notre chimpanzé n'a donc pas été préservé par la première inoculation du virus de macaque, inoculation n'ayant amené aucun processus local. Ce fait indique une fois de plus qu'un vaccin antisyphilitique doit être cherché plutôt parmi les virus capables de provoquer des accidents locaux, bien entendu aussi faibles que possible. Il est évident que le virus syphilitique de l'espèce de macaque que nous venons de mentionner (Macacus cynomolgus) est incapable de servir dans ce but. Inoculé en petite quantité, il ne donne lieu à aucun phénomène au point d'inoculation, tandis qu'introduit en quantité plus grande, il provoque des accidents beaucoup trop intensifs. Le chimpanzé dont nous n'avons rapporté qu'en partie l'histoire a manifesté plus tard des accidents secondaires sérieux. C'est chez lui que nous avons observé l'apparition d'érosions muqueuses à la langue et à la lèvre inférieure.

D'après nos expériences, le virus syphilitique s'atténue d'une

façon beaucoup plus grande après passage par une autre espèce de macaques, le macaque religieux des Hindous, ou bonnet chinois (Macacus sinicus) Dans notre second mémoire des Annales de l'Institut Pasteur, nous avons relaté l'histoire d'un chimpanzé, inoculé avec ce virus. Deux semaines après le début de l'expérience, il présenta des lésions tout à fait insignifiantes aux endroits inoculés, des petits points roses recouverts de petites squames qui disparurent au bout de quelques jours. Cet accident primaire si passager ne fut suivi d'aucune manifestation secondaire, mais le chimpanzé présenta plus tard une adénopathie généralisée. Un mois après la première inoculation, notre anthropoïde fut soumis à l'expérience d'épreuve : nous lui avons introduit par scarification du virus syphilitique d'origine humaine. Pendant les 3 mois 1/2 (104 jours) qu'a vécu le chimpanzé à partir de cette inoculation, il ne s'est développé chez lui aucun accident aux points de l'introduction du virus, ni la moindre manifestation secondaire à la peau et aux muqueuses. L'animal est mort en peu de jours d'une broncho-pneumonie double, causée par le pneumocoque. A l'autopsie, en dehors des lésions pulmonaires, les ganglions lymphatiques des aisselles, des aines et du mésentère ont été trouvés hypertrophiés, mais le ganglion cervical postérieur, qui était perceptible pendant la vie, n'a pu être retrouvé.

IV

SYPHILIS DES CATARRHINIENS INFÉRIEURS

Dans la recherche d'une vaccination antisyphilitique, les virus vivants atténués pouvant jouer un rôle considérable, il est important de se renseigner sur les manifestations de la syphilis chez les singes inférieurs. Jusqu'à présent, nous ne nous sommes servis que des singes de l'ancien continent, des Catarrhiniens, dans la supposition que les singes du nouveau monde, les Platyrhiniens, beaucoup plus éloignés de l'homme, doivent jouir d'une plus grande immunité antisyphilitique.

Une espèce de macaques à queue courte, le Macacus rhesus, accuse une certaine sensibilité pour la syphilis. Sur trois individus, inoculés par scarification à divers endroits de la peau avec du virus humain, un seulement a présenté, 23 jours après, un chancre induré de l'arcade sourcilière. Cet accident primaire

était guéri au bout de trois semaines et n'était suivi ni d'adénopathie, ni d'accidents secondaires d'aucune sorte.

Les macaques à longue queue sont plus sujets à la syphilis. Chez les bonnets chinois, l'accident primaire, de peu d'intensité, a été constaté par Maurice et Charles Nicolle. Sur 20 singes de cette espèce, étudiés par nous, 10 seulement, soit 50 0/0, ont présenté des lésions aux points d'inoculation, consistant en un chancre peu ou pas induré, avec tendance à une guérison rapide.

L'adénopathie légère n'a pu être constatée que dans quelques cas; quant aux accidents secondaires, nous ne les avons jamais observés d'une façon tant soit peu précise. Les vieux bonnets chinois se sont montrés le plus souvent réfractaires à la syphilis ; mais même parmi les jeunes, il s'en est trouvé un, âgé de peu de mois, qui a manisfesté une immunité complète.

Un macaque de Buffon (*Macacus cynomolgus*) a pu être inoculé avec succès par M Hamonic. Dans nos expériences il s'est montré plus sensible que le bonnet chinois. Ainsi sur 15 singes de cette espèce, inoculés par nous avec du virus syphilitique d'origine diverse (humaine et simiesque), 10, soit 66 0/0, ont manifesté des accidents primaires, analogues à ceux du bonnet chinois. Nous n'avons pu obtenir que des chancres au point d'inoculation, quelquefois une légère adénopathie locale et jamais d'accidents secondaires. Une fois il s'est développé, au voisinage du chancre, après sa guérison, une végétation pigmentée noire d'aspect semblable au lupus. La nature de cette lésion n'a pu être déterminée d'une façon précise. Les spécialistes dermatologues et syphiligraphes ont émis des avis différents. Les uns déclaraient la lésion syphilitique; les autres, et parmi eux M. le professeur Fournier, supposaient plutôt quelque affection secondaire de la peau, non syphilitique.

Un magot (*Inuus ecaudatus*), ainsi que deux cercopithèques (*C. pathas et C. callitriche*) inoculés par nous avec du virus humain, ont accusé une immunité rebelle.

Parmi les cynocéphales, un jeune mandril (*C. mormon*,) inoculé avec du virus du chimpanzé syphilitique, s'est montré réfractaire, tandis qu'un jeune hamadryas (*C. hamadryas*), inoculé avec de la sérosité des syphilides chancriformes d'une femme, a présenté des lésions typhiques. Après une période d'incubation

de 35 jours, aux endroits inoculés de l'arcade sourcilière, se sont formés plusieurs points rouges, recouverts de petites squames sèches. Cette lésion a progressé pendant quelque temps et ne s'est guérie qu'après trois semaines, en laissant comme trace une traînée pigmentée noire. Pendant quelque temps il a été possible de sentir à la palpation un petit ganglion de la région sous-maxillaire, du même côté que le chancre. Pendant les quatre mois de l'expérience il ne s'est manifesté aucun accident secondaire de la peau ni des muqueuses.

Récemment M. Zabolotny a publié un mémoire[1], dans lequel il décrit les accidents syphilitiques, obtenus chez un papion (*C. sphynx*) avec du virus humain. Il a pu observer un chancre induré au point d'inoculation, à la verge, ainsi que des manifestations secondaires sous forme de roséoles et de papules. M. Zabolotny a fait quatre passages sur des singes de même espèce, et a constaté chez eux les mêmes accidents primaires et secondaires.

Nous avons inoculé d'abord deux papions sphynx aux arcades sourcilières, aux paupières, aux cuisses et aux organes génitaux, avec du virus syphilitique de provenance humaine. Chez l'un d'eux il s'est développé aux paupières supérieures, deux semaines après l'inoculation, une rougeur assez étendue, recouverte de plusieurs squames sèches superficielles. Il ne s'est produit ni induration, ni œdème des paupières, pas plus que de l'adénopathie. L'accident primaire s'est guéri au bout de trois semaines, en laissant après lui une traînée pigmentée noire. Jusqu'à présent, depuis plus de trois mois, nous n'avons encore constaté aucune manifestation secondaire de la syphilis.

Un second papion sphynx, inoculé avec le virus des plaques muqueuses de la verge et de la lèvre d'un homme, n'a présenté depuis les 89 jours que dure l'expérience aucun symptôme morbide.

Deux autres papions de la même espèce, que nous devons à l'obligeance de M. Laveran[2], ont présenté des lésions syphilitiques plus accusées. Il s'est développé chez eux, 17 jours après

1. *Archives des Sciences biologiques.* Saint-Pétersbourg, t. XI, p. 155 (éd. russe).

2. Ces deux papions se sont montrés dans les expériences de M. Laveran absolument réfractaires aux trypanosomes de toute espèce. Il est donc peu probable que le microbe de la syphilis soit un trypanosome, comme on pourrait le supposer d'après l'analogie clinique entre la syphilis et la dourine des chevaux

l'inoculation avec du virus du chancre humain, des squames multiples, recouvrant une partie très hypérémiée des paupières supérieures Fig. 6, 7. Cet accident n'était accompagné ni d'induration des parties affectées, ni d'œdème, ni d'engorgemnt ganglionnaire. La guérison s'est accomplie en moins de trois semaines et n'a été suivie jusqu'à présent, c'est-à-dire dans l'espace de trois mois, d'aucune manifestation secondaire.

D'après nos observations, les lésions syphilitiques des cynocéphales se rapprochent beaucoup plus de celles des macaques que de la syphilis des anthropoïdes et de l'homme.

Il est incontestable que l'étude de toutes ces variétés morbides présente un grand intérêt au point de vue de la lutte contre la syphilis de l'homme. S'il est possible de tirer une indication de ces expériences. il semble que c'est dans le passage par l'organisme des cattarhiniens inférieurs qu'il faille chercher l'atténuation du virus syphilitique pour en faire un vaccin. Si le virus des bonnets chinois se montre trop pathogène, il faudra recourir à des espèces moins sensibles, telles que le *Macacus rhesus*. Dans le but de bien régler l'action virulente, il y aura lieu de se servir de virus, combinés avec l'emploi de sérums spécifiques.

Malgré les doutes exprimés par M. A. Neisser, nous sommes absolument persuadés de la nature syphilitique des lésions expérimentales des macaques. Leur transmission aux chimpanzés et les manifestations primaires et secondaires chez ces derniers suffisent pour entraîner la conviction.

Depuis les recherches de MM. Richet et Héricourt, on a essayé à maintes reprises de préparer des sérums anti syphilitiques, mais toutes les tentatives faites jusqu à présent n'ont donné que des résultats négatifs. Peut-être l'étude de la syphilis expérimentale des singes permettra-t-elle d'éclaicir cette question d'une façon plus précise. Peut être les espèces peu sensibles fourniront-elles des sérums plus actifs que ceux qui ont été préparés jusqu'à présent avec des animaux réfractaires. D'un autre côté des essais de sérothérapie faits sur des chimpanzés, au début de la maladie, et comparés avec des témoins bien choisis, donneront peut-être des résultats plus probants que ceux qui ont pu être obtenus chez l'homme.

Il ne faut pas oublier que l'étude de la syphilis des animaux

ne fait que débuter et qu'après les recherches d'orientation que nous venons de rapporter, il reste encore un champ d'expérience très vaste à parcourir.

En terminant ce mémoire nous exprimons toute notre reconnaissance à M. le Dr Gentil gouverneur du Congo et à M. le Dr Tautin, secrétaire général de la Guinée, pour l'aide si précieuse qu'ils nous ont donnée en nous procurant des chimpanzés. Nous remerçions aussi M. le Dr Pinard, médecin major des troupes coloniales, qui a mis généreusement à notre disposition un très beau chimpanzé qu'il avait ramené de la côte d'Afrique.

EXPLICATION DES FIGURES

Planche. V

Fig. 1. — Deux chancres de l'arcade sourcilière, au troisième jour. (Chimpanzé.)

Fig. 2. — Les mêmes chancres au dixième jour.

Fig. 3. — Deux petites taches syphilitiques du premier jour. (Chimpanzé.)

Fig. 4. — Les mêmes taches, transformées en vésicules.

Fig. 5. — Trois chancres du neuvième jour. (Chimpanzé.)

Fig. 6. — Accident primaire du Papio Sphynx. Sixième jour de la lésion.

Fig. 7. — Même accident au quatorzième jour.

Fig. 8. — Accident primaire du Macacus sinicus.

Planche. VI

Fig. 9. — Six petits chancres de la cuisse. Dixième jour de la lésion. (Chimpanzé.)

Fig. 10. — Plaques muqueuses de la langue et de la lèvre inférieure. (Chimpanzé.)

SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE

ET

LA FORMULE DE L'ADRÉNALINE

Par M. GABRIEL BERTRAND

En raison de l'importance prise au cours de ces dernières années, tant au point de vue physiologique qu'au point de vue thérapeutique, par la substance active des glandes surrénales désignées communément sous le nom d'adrenaline[1], on s'est efforcé d'élucider la composition, les propriétés et jusqu'à la constitution chimique de cette substance remarquable.

Malgré toutes les recherches, la formule brute de l'adrénaline n'est cependant pas encore établie avec certitude. Sans tenir compte des résultats obtenus à l'origine, avec des produits amorphes, par von Furth[2] et par Abel[3], on est en présence, aujourd'hui, de trois formules principales : celle de Takamine[4],

$$C^{10}\ H^{15}\ NO^{3}.$$

Celle d'Aldrich[5] :

$$C^{9}\ H^{13}\ NO^{3}.$$

Et, enfin, la dernière, proposée par Abel[6].

$$C^{10}\ H^{13}\ NO^{3},\ 1/2\ H^{2}O.$$

et maintenue par cet auteur, malgré les analyses de divers savants[7].

1. Et quelquefois sous celui d'épinéphrine, de suprarénine, etc.
2. *Zeitscht. f. physiolog. Chem.*, t. XXVI, p. 15-47 (1898).
3. *Idem*, t. XXVIII, p. 318-362 (1899).
4. *American Journ. of pharm.*, t. LXXIII, p. 523-531 (1901).
5. *American Journ. of physiolog.*, t. V, p. 457 (1901).
6. *Bericht d. d. chem. Ges.*, t. XXXVI, p. 1839-1847 (1903), et t. XXXVII, p. 368 381 (1904).
7. Von Furth, *Monatsh. f. chem.*, t. XXIV, p. 261-291 (1903). — Jowet, *Journ. of the chem. Soc.*, t. LXXXV, p. 192-197 (1904). — Pauly, *Bericht d. d. chem. Ges.*, t. XXXVI, p. 2944-2949 (1903), et t. XXXVII, p. 1388-1401 (1904). — Abderhalden et Bergell, *Id.*, t. XXXVII, p. 2022-2024 (1904).

Ces trois formules correspondent aux compositions centésimales suivantes :

	Takamine.	Aldrich.	Abel.
Carbone...............	60,91	59,01	58,82
Hydrogène............	7,61	7,10	6,86
Azote.................	7,10	7,64	6,86

Elles s'accordent assez mal, le plus souvent, avec les données numériques expérimentales qui ont été publiées.

Si on cherche d'où proviennent ces divergences, on les trouve, en dehors des écarts possibles dus aux méthodes analytiques, tout d'abord dans la difficulté de préparer convenablement des quantités notables d'adrénaline : cette substance n'existe dans les glandes surrénales qu'en très minime proportion; de plus, elle s'altère, principalement au contact de l'oxygène, avec une grande rapidité.

On est parvenu, il est vrai, dans les dernières expériences, à obtenir un produit blanc et tout à fait débarrassé du phosphate ammoniaco-magnésien, qui, passé d'abord inaperçu, a dû fausser bien des analyses; mais on n'a pas donné jusqu'ici la preuve de la pureté du produit soumis à la combustion. On s'est contenté, en général, de redissoudre et de reprécipiter en masse l'adrénaline que l'on voulait purifier; on a recommencé plusieurs fois ces opérations, souvent en faisant varier les acides et les bases, mais on n'a jamais démontré si on avait affaire à une substance unique ou, au contraire, à quelque mélange de substances voisines. C'est à cause de cela que les recherches les plus consciencieuses n'ont point encore apporté le résultat définitif. J'ai repris en conséquence l'étude systématique de l'adrénaline. Ce sujet m'intéressait, d'ailleurs, d'une façon particulière, l'adrénaline étant, en fait, la seule substance connue, d'origine animale, qui soit oxydable par la laccase [1].

J'ai cherché d'abord un procédé de préparation de l'adrénaline qui donnât un produit aussi pur que possible; puis, au lieu de soumettre directement ce produit à l'analyse élémentaire, je l'ai divisé, par deux séries de précipitations fractionnées, en petites portions correspondant chacune à environ 1/50 et même 1/60 de la masse initiale. C'est seulement par les résultats de l'analyse comparée de ces diverses portions qu'il a été pos-

1. G. Bertrand, *Comptes rendus Ac. des Sc.*, t. CXXXVIII, p. 649-650 (1904).

sible de s'assurer de l'existence d'une seule et même substance dans la préparation examinée, et de conclure, du même coup, avec certitude, à la formule brute de l'adrénaline.

Les glandes dont je me suis servi sont celles du cheval. On les enlève aussitôt après l'abattage, on les débarrasse complètement de la graisse qui peut y adhérer, puis on les passe rapidement au hache-viande. On introduit alors 600 grammes de la bouillie obtenue dans un flacon de 2 litres à large ouverture; on ajoute 5 grammes d'acide oxalique en poudre fine, puis, peu à peu et en agitant, assez d'alcool à 95 degrés pour remplir le flacon jusqu'au col. On bouche bien et, après 2 jours de macération, pendant lesquels on agite de temps en temps, on jette le tout sur une toile; enfin, on exprime à la presse.

La solution est filtrée et concentrée dans le vide, à la température du bain-marie, de manière à chasser tout l'alcool : il se sépare une grande quantité de lécithine fortement colorée. Pour l'enlever, on agite doucement le liquide trouble avec de l'éther de pétrole, et on laisse reposer dans une allonge à robinet.

La couche inférieure est décantée, précipitée exactement par l'acétate neutre de plomb et centrifugée.

On obtient ainsi une solution limpide, faiblement colorée en jaune, que l'on distille dans le vide jusqu'au volume de 60 à 80 c. c. et que l'on additionne d'un petit excès d'ammoniaque.

L'adrénaline se précipite aussitôt à l'état cristallisé[1]. Après une quinzaine de minutes, on la recueille à la trompe, on la lave à l'eau distillée, puis, afin de la purifier, on la redissout dans l'acide sulfurique à 10 0/0 (environ 2 fois et demi le poids de l'adrénaline supposée sèche). On ajoute à la solution 1 volume d'alcool et, après quelques instants de repos, on sépare à la trompe un peu de sulfate de plomb et de matières organiques insolubles. L'adrénaline est à nouveau précipitée par l'ammoniaque, lavée à l'eau, à l'alcool et desséchée dans le vide.

Toutes ces manipulations doivent être exécutées en évitant

1. Cette précipitation rappelle tout à fait celle du phosphate ammoniaco-magnésien ; il faut remuer le liquide en évitant de frotter les parois du vase, sinon l'adrénaline s'y attache fortement.

Si on a employé trop d'acétate de plomb pour déféquer le liquide, l'addition d'ammoniaque produit un précipité plus ou moins gélatineux (combinaison plombique d'adrénaline ?), difficile à filtrer. Il faut alors acidifier par l'acide sulfurique étendu, qui redissout l'adrénaline et insolubilise le plomb ; filtrer et précipiter ensuite par l'ammoniaque.

le plus possible l'action de l'oxygène, en s'aidant même du gaz carbonique, dont on emplit les flacons ou les appareils où s'accomplissent les diverses parties du traitement.

Si on laisse une proportion notable de l'adrénaline se transformer en corps brun par oxydation, il devient très difficile, en effet, d'obtenir un produit blanc.

Les rendements diffèrent à peine de ceux qui ont été fournis à l'aide d'autres méthodes, par les glandes surrénales de bœuf, de mouton ou de porc : 118 kilogrammes d'organes frais, provenant de 3,900 chevaux, m'ont donné environ 125 grammes d'adrénaline cristallisée, aussi pure que possible.

Le fractionnement a été effectué, en deux séries de précipitations, sur 110 grammes du précieux alcaloïde. On a dissout cette quantité d'adrénaline dans 600 c. c. d'acide sulfurique normal, puis ajouté, en plusieurs fois, une quantité d'ammoniaque suffisante pour précipiter le corps basique. A cause de l'équilibre exercé entre l'adrénaline et l'ammoniaque, il a fallu mettre un excès sensible de cette dernière, calculé par rapport à la quantité théorique. Après chaque addition d'ammoniaque, on recueillait à la trompe les cristaux qui s'étaient précipités, on les lavait à l'eau distillée et à l'alcool, puis on les séchait dans le vide[1]. On a obtenu ainsi sept portions :

La portion n°	1 pesait	14 grammes.
—	2	12 gr. 5.
—	3	12 grammes.
—	4	12 —
—	5	11 —
—	6	12 —
—	7	33 —

On a donc récupéré 106gr, 5 de produit sur les 110 grammes mis en œuvre. Chaque portion a maintenant été fractionnée à son tour de la même manière, afin d'augmenter les différences qui auraient pu exister entre les produits de tête et les produits de queue, dans le cas d'un mélange.

Portion n° 1. — Elle a donné 8 fractions de poids sensiblement égaux. La première de ces fractions, paraissant un peu trop colorée, n'a pas été soumise à l'analyse élémentaire. La seconde encore un peu jaune, a fourni les chiffres suivants :

1. Avant la dernière précipitation, on avait concentré la liqueur par distillation sous pression réduite.

	1re analyse	2e analyse	
Carbone	58,53	58,46	
Hydrogène	7,27	7,21	
Azote			7,74

Ces chiffres sont peu éloignés, on le voit, de ceux qui correspondent à la formule d'Aldrich.

Les nombres donnés par l'analyse de la huitième fraction sont encore plus voisins, ils sont pour ainsi théoriques :

Carbone	58,78	
Hydrogène	7,25	
Azote		7,66

Portions nos 6 et 7. — Ces portions de queue ont été divisées respectivement en 6 et en 9 fractions, aussi à peu près égales entre elles, dans chaque série; on a analysé les dernières.

Queue de la portion 6 :

Carbone	58,83	
Hydrogène	7,19	
Azote		7,63

Queue de la portion 7 :

Carbone	58,72	
Hydrogène	7,30	
Azote		7,69

Ces résultats concordants montrent d'abord que l'adrénaline extraite des glandes surrénales du cheval est une substance unique et non pas un mélange, ensuite, que la formule proposée par Aldrich, pour en représenter la composition, reste seule admissible.

Le poids moléculaire, trouvé par la cryoscopie de l'adrénaline en solution acétique, correspond bien d'ailleurs à la formule.

$$C^9 H^{13} NO^3$$

L'abaissement du point de congélation d'une solution de

0gr,985 de produit dans 38gr,250 de dissolvant a été, en effet, de 0O gr,576 d'où :

$$P\ M = \frac{39 \times 0{,}985 \times 100}{38{,}250 \times 0{,}576} = 174{,}3$$

tandis que la théorie indique 183.

C'est là un point qu'il était nécessaire de fixer avant de pénétrer plus avant dans l'étude systématique de l'adrénaline.

Recherches sur l'agglutination des globules rouges par les précipités chimiques ET SUR LA SUSPENSION DE CES PRÉCIPITÉS dans les milieux colloïdaux

PAR LE Dr OCT. GENGOU

(Travail de l'Institut Pasteur du Brabant.)

Les substances colloïdales jouent, dans les phénomènes vitaux, un rôle tellement considérable que les biologistes s'attachent à suivre avec attention les progrès faits par la chimie et la physique dans l'étude de ces substances. L'analyse des propriétés des colloïdes organiques est fortement compliquée par l'ignorance où nous sommes de leur composition ; aussi est-il naturel que l'on se reporte volontiers aux renseignements que nous donne l'étude de colloïdes plus simples. On se borne, du reste, le plus souvent à chercher dans les règles qui suivent les réactions des colloïdes inorganiques, l'explication des observations faites sur les substances colloïdales du monde vivant. Parmi les phénomènes présentés par ces deux groupes de substances, il en est un qui prête beaucoup à la comparaison, c'est celui de l'agglutination. Les travaux qui s'en occupent abondent; mais les récentes publications de Perrin sur les substances colloïdales ont provoqué chez les biologistes des recherches des plus actives sur ce phénomène.

L'agglutination des microbes et des globules par les sérums, notamment par les sérums spécifiques, si fouillée déjà, intrigue cependant encore; son essence même nous échappe. L'analogie d'aspect qu'elle présente avec la précipitation des colloïdes, a fait naître l'espoir d'en trouver l'explication dans l'analyse méthodique de cette dernière. Aussi sont-ils déjà nombreux, les travaux où depuis les publications de Perrin, on s'est occupé soit de la précipitation des colloïdes, soit de l'agglutination des globules rouges par des substances en suspension (colloïdes, précipités chimiques), soit d'un rapprochement entre ces deux phénomènes.

Ce sont, pensons-nous, Landsteiner et Jagic[1] qui ont, les premiers, signalé l'agglutination des globules rouges par un colloïde bien défini, l'acide silicique colloïdal. Peu après, nous avons nous-même[2] relaté des exemples d'agglutination et d'hémolyse des globules rouges par les précipités chimiques, tels que $CaFl^2$, $BaSO^4$. Mme Girard-Mangin et M. V. Henri[3] ont, à leur tour, étudié la question d'une façon très étendue et très minutieuse, au moyen de colloïdes divers.

Ainsi que nous l'avons montré antérieurement, certains précipités chimiques, de même que les colloïdes, agglutinent les globules rouges, à la condition que ceux-ci soient lavés de tout sérum ; cette agglutination est suivie de l'hémolyse des globules, phénomène sur lequel nous avons déjà fourni quelques indications dans notre première note[2]. Cette agglutination et cette hémolyse sont, au contraire, empêchées par la présence de quantités même très faibles de sérum.

Nous nous occuperons ici uniquement de l'agglutination des globules; nous comptons revenir plus tard sur leur dissolution. Mme Girard-Mangin et V. Henri ont vu que l'agglutination des globules se produit aussi bien avec des colloïdes négatifs qu'avec des colloïdes positifs. Cependant, les globules rouges sont, par le passage d'un courant électrique, déplacés vers l'anode[3], ce qui autorise à les considérer comme ayant une charge électrique négative, ainsi qu'on l'a fait pour les colloïdes qui suivent la même direction sous l'influence d'un courant électrique. Cette agglutination d'une émulsion négative (globules) par des colloïdes également négatifs, ne cadre évidemment pas avec les idées généralement admises sur la façon dont se comportent les uns vis-à-vis des autres des colloïdes possédant des charges électriques de même signe. Dans un mélange de colloïdes de même signe électrique, en effet, il ne se produit pas de floculation; les deux colloïdes restent en suspension[4]. Aussi Mme Girard-Mangin et V. Henri n'admettent-ils pas que l'agglutination des globules rouges par les colloïdes soit due à une action directe de ces éléments les uns sur les autres. Pour eux, cette agglutination n'est qu'un fait indirect, secondaire; le globule ne joue dans ce phénomène

1. Landsteiner et Jagic, *Wien. klin. Wochenschr.*, 1904, n° 3.
2. Gengou, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 11 avril 1904.
3. Mme Girard-Mangin et V. Henri, *Soc. de Biol*, 1904, nos 19, 20, 21, 24, 25.
4. Henri, Lalou, Mayer et Stodel, *Soc. de Biol.*, 1903, 19 décembre.

qu'un rôle passif; les rôles actifs sont tenus par les colloïdes d'une part, de l'autre par les sels endoglobulaires que les globules laissent diffuser dans le liquide.

On sait, en effet, qu'un certain nombre de colloïdes — et c'est le cas pour ceux que Mme Girard-Mangin et V. Henri ont étudiés — sont floculés par les électrolytes. Or, quand des globules rouges séjournent dans de l'eau physiologique, ils laissent diffuser leurs sels, et il est bien évident que ceux-ci, pendant toute la durée de leur diffusion hors de l'hématie, seront plus abondants dans la zone périglobulaire, immédiatement voisine du globule, que dans le liquide interglobulaire situé à quelque distance de ce globule. Aussi, pensent Mme Girard-Mangin et V. Henri, les colloïdes introduits dans une émulsion de globules qui laissent diffuser leurs sels seront-ils de préférence précipités dans la zone périglobulaire, plus concentrée.

A ce premier acte en succéderait un second, dans lequel les particules de colloïde, floculées autour des globules par les sels endoglobulaires, se rassembleraient en paquets, entraînant avec elles les globules; d'où la formation d'amas constitués de colloïdes et de globules.

Dans cette théorie, l'agglutination des globules par les colloïdes repose sur la précipitation *préalable* de ces derniers autour des globules, par les électrolytes endoglobulaires diffusés. Les globules restent pendant toute l'action absolument passifs; ils sont simplement entraînés par suite du rapprochement des particules de colloïdes précipitées autour d'eux.

Nous ne pensons pas qu'il faille interpréter de la sorte le phénomène de l'agglutination des globules par les colloïdes; pour nous, cette agglutination a pour point de départ une action directe de ces éléments l'un sur l'autre[1]. Nous croyons que nous pouvons en effet rapporter à l'agglutination des globules par les colloïdes, les conclusions qui découlent de faits que nous avons observés en remplaçant les colloïdes par les poudres, — ils sont du reste du même ordre; nous nous basons en cela sur l'opinion de Bredig [2], qui pense que les solutions colloïdales et

1. Il va de soi qu'il ne s'agit pas ici de discuter l'action, démontrée depuis longtemps, des sels dans les phénomènes d'agglutination en général; nous ne visons que le rôle attribué par Mme Girard-Mangin et V. Henri, dans l'agglutination des globules par les colloïdes, aux sels diffusés des hématies.

2. Bredig, *Anorganische Fermente.*

les suspensions fines ne diffèrent les unes des autres que par la grosseur de leurs particules. Cette opinion est du reste partagée, en ce qui concerne les phénomènes dont il s'agit ici, par Landsteiner et Jagic[1], par Mme Girard-Mangin et V. Henri[2].

Faisons remarquer d'abord que les colloïdes étudiés par ces derniers auteurs sont très sensibles à l'action floculante des électrolytes; ils pourraient donc l'être aussi à celle des électrolytes endoglobulaires diffusés; mais il ne s'ensuit pas que ce soit nécessairement là qu'il faille chercher la cause de leur pouvoir agglutinant sur les globules.

Il n'est pas nécessaire en effet, pour que l'agglutination des globules par une poudre soit possible, que celle-ci soit sensible à l'action précipitante des sels diffusant des globules. En effet, nous avons constaté que $BaSO^4$ agglutine parfaitement les globules; or $BaSO^4$ est bien plus sensible à l'action de la pesanteur qu'à celle des électrolytes; même exposé à des concentrations salines très fortes, il n'est pas plus floculé que dans l'eau distillée, où il se sédimente assez vite.

Nous nous sommes proposé de rechercher si une poudre, capable d'être floculée par les électrolytes, peut encore, après floculation, agglutiner des globules. Nous avons employé $CaFl^2$ précipité d'un aspect assez colloïdal et qui est floculé même par NaCl 8 0/00. Or $CaFl^2$, floculé au préalable par NaCl 8 0/00 ou 2 0/0, agglutine encore instantanément, et aussi bien que s'il était en émulsion dans l'eau distillée, les globules contenus dans l'eau physiologique à 6 0/00 par exemple. Toutefois si l'on augmente jusqu'à 3 0/0 la concentration saline du liquide contenant $CaFl^2$, celui-ci n'agglutine plus aussi bien. Ce fait prouve simplement, à notre avis, que lorsqu'on a accumulé en amas très denses beaucoup de précipité colloïdal, ces amas sont moins actifs sur les globules; mais cela tient uniquement à ce que, dans ce cas, le mélange intime des globules et de $CaFl^2$ n'est plus possible. Quand, au contraire, les amas sont plus lâches ($CaFl^2$ dans NaCl à 8 0/00, à 2 0/0) et par conséquent plus dissociables, l'action de la poudre sur les globules n'est que très peu atténuée. Il ne faut pas forcément conclure de ces faits que l'agglutination des globules par $CaFl^2$ n'est

1. Landsteiner et Jagic, *Munch. med. Woch.*, n° 27, 1904.
2. Mme Girard-Mangin et V. Henri, *Soc. de Biol.*, n° 19, 1904.

possible que si ce dernier se trouve dans un état de dissociation lui permettant d'être floculé près des globules par les sels endoglobulaires en voie de diffusion, mais simplement que plus le mélange de globules et de $CaFl^2$ est intime, plus l'agglutination est intense[1].

Si, comme le veulent Mme Girard-Mangin et V. Henri, les colloïdes sont floculés autour des globules avant de les agglutiner, cette floculation repose en somme sur une différence de concentration saline entre la zone périglobulaire riche en sels, car elle contient des sels endoglobulaires, et le liquide interglobulaire, plus pauvre. Si cette différence était supprimée, il n'y aurait plus de raison pour que les colloïdes soient floculés de préférence autour des globules, et conséquemment l'agglutination de ces derniers par les colloïdes devrait être nulle ou tout au moins diminuée. Nous avons recherché si cette conséquence est vérifiée par l'expérience. Introduisons dans un grand volume d'eau physiologique une certaine quantité de globules rouges bien lavés; laissons-les dans ce liquide pendant 3 ou 4 heures, en ayant soin de les agiter de temps à autre. Il va de soi que plus la diffusion des sels endoglobulaires se prolonge, plus la teneur saline du liquide interglobulaire se relève, et plus l'équilibre entre ce dernier et la zone périglobulaire se réalise. D'autre part, les globules perdant de plus en plus leurs électrolytes, leur teneur saline se rapproche progressivement de la concentration du liquide où ils baignent. Au bout d'un certain temps, par conséquent, un équilibre salin se sera fait entre les globules et le liquide. Centrifugeons à ce moment et décantons le liquide surnageant; nous avons ainsi un liquide A (eau physiologique + sels endoglobulaires diffusés) et des globules D, déchargés de ces sels.

Introduisons dans un tube (tube 1) un volume déterminé de liquide A, et dans un autre tube (tube 2) une quantité égale d'eau

1. Il est probable qu'il en est de même pour les solutions colloïdales, qui seront évidemment d'autant moins actives qu'elles seront davantage floculées par les électrolytes. Mme Girard-Mangin et V. Henri prétendent que les colloïdes floculés n'agglutinent plus les globules; au contraire, Landsteiner et Jagic trouvent que cette floculation préalable des colloïdes ne diminue pas leur pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules. Il est possible que tous ces expérimentateurs aient raison, que l'on puisse floculer les colloïdes à des stades divers et obtenir des colloïdes floculés agglutinants ou non agglutinants, suivant que les électrolytes ont formé des flocons lâches ou denses, c'est-à-dire suivant que le mélange des colloïdes et des globules est encore possible.

physiologique; ajoutons à tous deux la même dose de $CaFl^2$ et laissons au repos pendant 1/2 heure; les sels endoglobulaires contenus dans le liquide A auront ainsi le temps d'agir sur la poudre. Ajoutons ensuite à chacun de ces tubes la même quantité de globules D (déchargés de leurs sels). Aussitôt l'agglutination des globules se produit. Il n'y a pas de différence dans l'intensité de l'agglutination que présentent les deux tubes, et cependant les conditions expérimentales sont loin d'être identiques dans les deux cas. En effet, comme on peut le remarquer, nous nous sommes servi de globules D et non de globules neufs. Nous avons agi de la sorte parce que ces globules D ont été auparavant en contact pendant longtemps avec le liquide A; les teneurs salines des globules et de ce liquide A ont donc été sensiblement égalisées, de sorte que les globules D remis dans le tube 1 où se trouve du liquide A n'auront plus rien à céder à ce liquide; dans celui-ci la zone périglobulaire ne sera donc pas plus riche en sels que le liquide interglobulaire. Au contraire, dans le tube 2, les globules D rencontrent de l'eau physiologique sans sels endoglobulaires; leur teneur saline est donc plus élevée que celle de cette eau. Aussi vont-ils laisser diffuser leurs sels et créer ainsi une zone périglobulaire plus salée que le liquide interglobulaire. En somme, dans le tube 1, zone périglobulaire et liquide interglobulaire de même concentration; dans le tube 2, zone périglobulaire plus salée que le liquide interglobulaire. L'agglutination des globules par $CaFl^2$ devrait donc être plus intense dans le tube 2 que dans le tube 1, si les sels de la zone périglobulaire jouaient un rôle dans ce phénomène.

Et dans cette hypothèse, il y aurait dans notre expérience encore une seconde raison, pour que l'intensité de l'agglutination soit différente dans les tubes. En effet, puisque nous avons introduit $CaFl^2$ longtemps avant les globules, cette poudre sera soumise à l'action floculante de l'eau physiologique dans le tube 2 et à celle du liquide A dans le tube 1. Or ce liquide A, contenant des sels endoglobulaires, devrait être plus floculant que l'eau physiologique; par conséquent $CaFl^2$, plus floculé dans le tube 1 que dans le tube 2, devrait y être moins actif sur les globules. Or, comme nous l'avons vu, les choses ne se passent pas ainsi; au surplus, $CaFl^2$ n'est pas floculé davan-

tage dans le tube 1 que dans le tube 2; s'il est sensible, ainsi que nous l'avons dit, à l'eau physiologique, le surcroît salin du tube 1, dû aux sels endoglobulaires, n'occasionne pas une floculation plus intense de la poudre.

Cette expérience montre donc que l'agglutination des globules par $CaFl^2$ ne perd pas de son intensité, si, par des manipulations appropriées, on ramène à un minimum, l'influence floculante que pourrait avoir sur cette poudre la zone périglobulaire, riche en sels endoglobulaires diffusés, ce qui tend à enlever à cette zone toute intervention dans l'agglutination des hématies par les poudres.

On pourrait cependant nous objecter que dans de telles expériences, on ne pousse jamais assez loin la diffusion des sels endoglobulaires et que la concentration saline de la zone périglobulaire est toujours suffisante pour déterminer la précipitation du colloïde ou de la poudre autour des globules. Nous avons signalé dans notre première note un fait qui répond à cette objection : faisons sortir des globules tout ce qu'ils sont susceptibles d'abandonner. Dans ce but, laquons ces globules par l'eau distillée; puis lavons-les plusieurs fois à l'eau salée à 7 0/00; nous estimons qu'après quelques lavages, la teneur saline dans le stroma, et par suite dans la zone périglobulaire, ne peut plus dépasser celle du liquide interglobulaire; nous n'avons donc plus à tenir compte, dans toutes les parties de l'émulsion de stromas, que du NaCl de l'eau physiologique. Puisqu'il n'y a plus de sels endoglobulaires qui diffusent des stromas, ceux-ci ne devraient pas être agglutinables par un colloïde ou une poudre. Or, si à ces stromas on ajoute un peu de $CaFl^2$, on observe une agglutination absolument comparable à celle des globules rouges; il en est de même si on remplace $CaFl^2$ par $BaSo^4$ ou l'hydrate ferrique colloïdal.

Nous ne croyons pas qu'il y ait lieu d'admettre pour l'agglutination des stromas et pour celle des globules rouges par les colloïdes et les poudres des explications différentes. Tout ce qu'on observe, en effet, dans l'agglutination des globules par une poudre, par $CaFl^2$ par exemple, on le retrouve dans l'agglutination des stromas provenant de ces globules, par la même poudre. Ainsi, dans les deux cas, l'intensité de l'agglutination dépend de la quantité de fluorure employée; le maximum se

produit avec une dose optimale, en dessous et au-dessus de laquelle l'agglutination diminue. Dans les deux cas aussi, l'addition d'une faible quantité de sérum empêche l'agglutination. Les deux phénomènes sont donc abosolument superposables, ce qui, à notre avis, montre à l'évidence que dans l'agglutination des globules par les poudres, les sels endoglobulaires diffusés n'ont pas à floculer ces poudres, pour que l'agglutination se fasse; l'action fondamentale se passe entre les éléments albuminoïdes (stromas) des globules, et les poudres [1].

A vrai dire, il est une conséquences de la théorie de Mme Girard-Mangin et V. Henri qui semble vérifiée par l'expérience; mais ce n'est là, comme nous allons le voir, qu'une apparence, le phénomène dont nous voulons parler devant recevoir une explication différente de celle qui lui reviendrait de par cette théorie. Voici ce dont il s'agit : si les sels endoglobulaires intervenaient en floculant les colloïdes et les poudres autour des globules, on devrait, en extrayant ces sels des globules par le laquage, obtenir un liquide L qui, debarrassé de stromas par la centrifugation, empêcherait l'agglutination de nouveaux globules par une poudre ; il devrait surtout en être ainsi, si dans ce liquide L on introduit la poudre avant les nouveaux globules, ce qui lui permetrait d'être floculée par les sels endoglobulaires contenus dans le liquide. Laquons donc des globules dans l'eau distillée; ajoutons ensuite assez de NaCl pour y ramener la teneur saline de l'eau physiologique à 7 0/00 et éloignons les stromas par la centrifugation; puis décantons le liquide surnageant qui s'est chargé de tout ce qui peut diffuser des globules. Introduisons dans un volume déterminé de ce liquide, des quantités connues de $CaFl^2$, de $BaSO^4$ ou d'hydrate ferrique colloïdal, et après un certain temps additionnons tous ces mélanges d'une petite dose de globules neufs lavés. Nulle part il n'y a agglutination. Le liquide où l'on a laqué des globules, privé de

1. Notons, en effet, que l'agglutination des stromas peut être obtenue par $BaSo^4$ contenu soit dans de l'eau distillée, soit dans de l'eau chlorurée même à 20/0, il nous paraît difficile d'admettre que cette poudre, si insensible aux electrolytes, soit influencée par les traces de sels qui pourraient encore diffuser des stromas.
Mme Girard-Mangin et V. Henri ont observé des phénomènes analogues dans l'agglutination des globules par les colloïdes; les stromas sont aussi agglutinés par ces derniers. Aussi pensons-nous qu'il n'y a pas lieu d'admettre dans ce cas non plus le rôle actif que ces auteurs attribuent aux sels endoglobulaires.

stromas, empêche donc complètement l'agglutination de nouveaux globules par les poudres ou par l'hydrate ferrique.

Ce fait, qui cadre si bien à première vue avec les idées de Mme Girard-Mangin et V. Henri, ne peut cependant s'expliquer, pensons-nous, par la théorie émise par ces auteurs. Si, en effet, le pouvoir empêchant de ce liquide était dû à des sels endoglobulaires diffusés, il devrait résulter de la précipitation des colloïdes et des poudres par ces sels; cette précipitation survenant dans ce cas en l'absence de globules introduits dans la suite. Or, on n'observe pas cette précipitation des colloïdes ou des poudres dans le liquide de laquage; c'est précisément l'inverse que l'on constate. Tandis que l'eau physiologique flocule assez rapidement $CaFl^2$, l'hydrate ferrique et laisse $BaSO^4$ se sédimenter assez vite, le liquide L, dépouillé de stromas, maintient assez longtemps ces poudres en suspension et même l'hydrate ferrique si sensible cependant aux sels. Les électrolytes de ce liquide ne pouvant avoir qu'une action floculante, ne sont évidemment pas responsables de cette suspension[1].

Nous croyons (bien que cette opinion ne repose pas sur une démonstration expérimentale irréfutable) que si l'hydrate ferrique et $CaFl^2$ ne sont pas précipités par les électrolytes du liquide L et que si $BaSO^4$ reste dans ce dernier finement dissocié, cela tient à ce qu'ils sont maintenus en émulsion par des colloïdes, probablement albuminoïdes, sortis des globules lors du laquage. Il s'agirait d'un phénomène identique à l'action dissociante du sérum sur $BaSo^4$, action que nous avons signalée antérieurement et sur laquelle nous allons revenir tantôt. Ce pouvoir dissociant est épuisable, comme le pouvoir dissociant du sérum; si nous voulons l'attribuer à une substance, nous dirons que cette substance peut être enlevée au liquide de laquage. Pour le prouver, introduisons une quantité un peu forte de $CaFl^2$ dans ce liquide L sans stromas ; puis, après un contact d'une quinzaine de minutes, éloignons $CaFl^2$ par la centrifugation. Nous obtenons alors, par décantation, un liquide A qui ne diffère du liquide initial de laquage L que par le fait d'avoir subi l'action d'une forte dose

1. Neisser et Friedmann* ont vu, il est vrai, que des colloïdes, floculés par des doses déterminées de sels, ne le sont plus si l'on exagère la quantité de sel, mais il s'agit dans leurs expériences de sels de métaux lourds, et ils ont pu rapporter ce fait à la formation d'hydrate colloïdal par l'hydrolyse de ces électrolytes. Ce n'est évidemment pas le cas pour les sels qui diffusent des globules rouges.

* NEISSER et FRIEDMANN, *Münch. med. Woch.*, 1904, n° 11.

de fluorure. Or, tandis que, comme nous venons de le voir, la floculation de $CaFl^2$ et de l'hydrate ferrique, la sédimentation de $BaSO^4$ introduits dans le liquide L, sont empêchées, cette floculation et cette sédimentation se produisent très bien dans le liquide A. De plus, alors que l'agglutination des globules neufs par les poudres et par l'hydrate ferrique ne se fait pas dans le liquide L, elle se fait parfaitement dans le liquide A.

Quelque chose a donc été enlevé du liquide L par la forte dose de $CaFl^2$, quelque chose qui empêchait d'une part la floculation de $CaFl^2$, de l'hydrate ferrique par les électrolytes ainsi que la sédimentation de $BaSO^4$; d'autre part, l'agglutination des globules par ces trois corps. Nous croyons que ces substances (ou cette substance ?) sont des colloïdes albuminoïdes sortis des globules lors du laquage; nous basons cette hypothèse sur les résultats que nous a donné l'étude de l'action empêchante du sérum (albuminoïdes colloïdaux) sur l'agglutination des globules par les poudres[1].

Une fois ces colloïdes enlevés, on a donc un liquide (liquide A) où la floculation de $CaFl^2$ et de l'hydrate ferrique par les sels endoglobulaires diffusés lors du laquage peut se faire, et en effet, ces substances floculent. Mais cela ne les empêche nullement d'agglutiner les globules que l'on ajoute ensuite. Ces expériences montrent, à notre sens, que les sels endoglobulaires, extraits par le laquage, ne s'opposent pas à l'agglutination de globules neufs par les poudres ou les colloïdes; nous avons vu tantôt que d'autre part les stromas, privés de sels endoglobulaires sont, tout autant que les globules, agglutinables par les colloïdes et les poudres.

En résumé il ressort de tout ceci qu'en ce qui concerne les poudres que nous avons employées, il n'est pas nécessaire, pour expliquer leur action agglutinante sur les globules, de supposer une floculation de ces poudres par les sels endoglobulaires diffusés de ces globules. Nous avons vu, en effet : 1° que cette agglutination est encore possible par les poudres floculées au préalable par les électrolytes; 2 qu'il en est de même si l'on ramène au minimum la surcharge saline de la zone périglobulaire des hématies, de façon à annihiler

1. Nous avons, en effet, signalé dans notre première note — nous nous bornerons en ce moment à rappeler le fait — que si le sérum empêche l'action agglutinante des poudres sur les globules, on peut lui enlever ce pouvoir empêchant en le traitant au préalable par une forte dose de $CaFl^2$ ou de $BaSO^4$.

l'action floculante hypothétique de cette zone sur les poudres ; 3° que les phénomènes d'agglutination des stromas et des globules par les poudres sont identiques ; 4° que la sensibilité de celles-ci à l'action floculante des sels n'est pas une condition sine qua non de leur pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules $BaSO^4$. Toutes les particularités de l'agglutination des globules par les poudres s'observant aussi si on remplace ces dernières par des colloïdes, nous pensons que, si ceux-ci sont réellement floculés par les sels endoglobulaires diffusés, ce n'est pas là la cause de leur pouvoir agglutinant sur les hématies.

Nous nous sommes du reste efforcé de démontrer ce fait d'une façon plus directe ; nous avons recherché si l'on n'obtiendrait pas des phénomènes d'agglutination analogues à ceux que nous avons rapportés jusqu'ici en faisant agir nos poudres non sur des globules rouges, mais sur une émulsion dont les particules ne contiendraient pas de sels et ne pourraient par conséquent en laisser diffuser. Nous avons employé à cette fin des émulsions d'huile dans l'eau, que nous avons préparées en ajoutant 5 gouttes d'huile d'olive à 10 c. c. d'eau distillée, additionnée de 1/10,000 de carbonate de soude. Ces émulsions, à peine alcalines, peuvent être d'ailleurs neutralisées et même acidifiées, sans présenter aucune modification. Nos expériences ont été faites avec des émulsions neutralisées aussi exactement que possible. Dans ces conditions, on voit les gouttelettes d'huile de l'émulsion et les poudres qu'on y ajoute ($CaFl^2$, $BaSO^4$) s'agglutiner réciproquement en gros amas; il en est de même si l'on fait agir sur ces émulsions d'huile l'hydrate ferrique colloïdal. Tous les flocons ainsi obtenus se montrent, au microscope, formés de la poudre ou de l'hydrate, et parsemés de gouttelettes d'huile. De même que nous l'avons observé dans l'agglutination des globules rouges par les précipités chimiques, l'addition d'une quantité très faible de sérum empêche complètement l'agglutination des globules d'huile par les poudres et l'hydrate ferrique.

Etant donnée l'analogie complète que présente l'agglutination des globules rouges et des globules d'huile par les précipités chimiques et par l'hydrate ferrique, nous pensons que le phénomène relève dans les deux cas des mêmes causes, et que l'agglutination des hématies par les poudres et les colloïdes

n'est pas une conséquence indirecte de l'action d'électrolytes sur ces derniers, mais qu'elle a pour point de départ une action directe de ces éléments les uns sur les autres.

***

Nous venons de voir que certaines poudres ($CaFl^2$, $BaSO^4$,) agglutinent les globules ; remplaçons maintenant les globules par du sérum et mettons ces deux poudres en contact de petites quantités de ce dernier : $CaFl^2$, est agglutiné tandis que $BaSO^4$ se comporte d'une façon absolument différente. Introduit dans de l'eau physiologique, $BaSO^4$ subit très bien l'action de la pesanteur et descend assez rapidement au fond du tube ; dans du sérum, au contraire, il ne descend plus ou ne se sédimente que très lentement ; il reste dans le liquide à un état de division extrêmement fine. Cette action dissociante du sérum sur $BaSO^4$ est très marquée ; elle est, en effet, encore visible, si nous ajoutons à 1 c. c., par exemple, d'eau physiologique à 8 0/00, contenant 4 gouttes de notre émulsion de $BaSO^4$, 1 goutte de sérum dilué au 1/20.

Il y a donc, d'un côté, agglutination ($BaSO^4$ et globules), de l'autre un phénomène tout à fait différent, une dissociation de la poudre ($BaSO^4$ et sérum). Or on admet généralement que les albuminoïdes du sérum sont en solution colloïdale. L'émulsion de globules et le sérum sont donc tous deux des émulsions d'albuminoïdes, dont les particules sont volumineuses dans la première, extrêmement petites dans la seconde. De plus, toutes deux ont la même charge électrique, négative[1]. Comment se fait-il, dès lors, que l'addition d'une même substance $BaSO^4$, à deux émulsions si comparables (globules et sérum), donne lieu à des phénomènes d'aspect aussi opposé ? Agglutination et dissociation semblent en effet le contraire l'une de l'autre ; mais sont-elles réellement aussi opposées qu'elles le paraissent à première vue ? Ne sont-elles pas simplement deux conséquences très différentes d'un seul et même phénomène fondamental, dont l'aboutissant nous apparaîtrait, suivant les cas, être une agglutination ou une dissociation ?

1. N'oublions pas cependant que si, pour Mme Girard-Mangin et V. Henri *, le sérum peut être considéré comme un colloïde négatif, d'autres auteurs, notamment Neisser et Friedemann **, se basant sur les travaux de Hardy, font à ce sujet leurs réserves.

* Mme GIRARD-MANGIN et V. HENRI, *Soc. de Biol.*, 1904, n° 24.

** NEISSER et FRIEDMANN, *l. c.*

Lorsque nous voyons les globules et $BaSO^4$ s'agglutiner, il nous faut bien admettre une adhésion entre la poudre et les globules. Lorsque au lieu de globules on emploie du sérum et que $BaSO^4$ est dissocié par celui-ci, une adhésion ne se produirait-elle pas aussi entre la poudre et les particules alluminoïdes du sérum ? Dès lors, le phénomène fondamental serait une adhésion de la poudre avec les globules, d'une part, avec les albuminoïdes du sérum, de l'autre ; mais cette adhésion serait suivie tantôt d'une agglutination des deux éléments ($BaSO^4$ et globules), tantôt d'une dissociation de la poudre ($BaSO^4$ et sérum).

Voici les expériences que nous avons établies pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse :

1re *Expérience.* — Si une adhésion existe entre les particules albuminoïdes du sérum et $BaSO^4$, le pouvoir dissociant du sérum vis-à-vis de cette poudre, doit avoir une limite. Pour nous en assurer, nous allons faire agir sur une petite quantité de sérum, une forte dose de $BaSO^4$. Centrifugeons d'abord 5 tubes contenant chacun 2 c. c. de notre émulsion de sulfate, puis rejetons les liquides surnageants. Délayons ensuite l'un des culots ainsi obtenus dans le sérum à expérimenter (5/10 c. c. de sérum frais de cheval dilué avec 1,5 c. c. d'eau physiologique). Après quelques minutes de contact, centrifugeons et délayons de même, dans le liquide décanté de ce premier tube, le deuxième culot ; puis passons au troisième, et ainsi de suite. Après cela, faisons agir le sérum ainsi traité sur une petite dose de $BaSO^4$; nous constatons qu'il n'a plus aucune action dissociante sur cette poudre ou une action infiniment plus faible que le sérum dilué d'où nous sommes parti. De même il n'agglutine plus $CaFl^2$ et n'empêche plus l'agglutination des globules ni par $CaFl^2$, ni par $BaSO^4$. La solution colloïdale que constitue le sérum perd donc ses substances albuminoïdes par son contact avec de fortes doses de $BaSO^4$, tout comme une émulsion de globules rouges, qui agglutine le sulfate, perd ses globules.

2e *Expérience.* — Si la comparaison est juste, nous devons admettre qu'au $BaSO^4$ mélangé à du sérum, adhérent les colloïdes du sérum qui le maintiennent dissocié, comme les globules s'unissent au sulfate pour former des amas. Si on lave à plusieurs reprises dans l'eau physiologique ces amas qui sont le résultat de l'adhésion des globules et de la poudre, ils persistent, c'est-

à-dire que l'union des deux éléments se conserve. Si nous lavons de même du sulfate de baryum qui a été au contact de sérum, restera-t-il dissocié, c'est-à-dire l'adhésion de la poudre aux colloïdes dissociants du sérum persistera-t-elle?

Une certaine quantité de $BaSO^4$ (12 gouttes de notre émulsion) est mélangée à une forte dose de sérum de cheval (3 c. c. de sérum frais dilué au 1/4); on centrifuge après 15 minutes environ. Le culot est ensuite lavé dans l'eau physiologique jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus trace de sérum libre, ce dont on est certain quand ces eaux, portées à l'ébullition, ne blanchissent pas, ou encore quand elles ne dissocient plus du nouveau sulfate. Or si, à ce moment, nous reportons dans de l'eau physiologique le sulfate qui a été au contact du sérum, il reste émulsionné. Nous avons obtenu de la sorte une émulsion différant complètement du $BaSO^4$ neuf contenu dans l'eau physiologique; cette émulsion, d'un aspect très colloïdale, ressemble à du lait ; elle finit toutefois par se clarifier, mais sans qu'il paraisse y avoir une agglutination de ses particules, car une légère secousse remet le tout en parfaite émulsion.

Cette expérience est la contre-partie de la précédente : le sérum doit son pouvoir dissociant à des substances colloïdales qui adhèrent au $BaSO^4$, tout comme les globules s'accollent à cette poudre.

3e *Expérience.* — Nous avons cherché à démontrer d'une façon plus directe l'union qui s'établit entre les colloïdes du sérum et les poudres que ce sérum dissocie. Comme on va le voir, nous avons pu remettre en liberté ces colloïdes, les séparer de la poudre à laquelle ils s'étaient attachés. Pour cela, il était nécessaire de pouvoir éliminer cette poudre, par exemple en la dissolvant; nous nous sommes servi à cet effet non du $BaSO^4$ difficile à dissoudre, mais de phosphate tricalcique en émulsion dans l'eau distillée. De même que $BaSO^4$, le phosphate tricalcique, qui se sédimente assez rapidement dans l'eau physiologique et dans l'eau distillée, reste longtemps en émulsion en présence de sérum de cheval : 3 gouttes de notre émulsion, par exemple, restent longtemps dissociées dans 1 c. c. de sérum frais dilué au 1/10. Saturons donc de sérum (4 c. c. de sérum dilué au 1/4 par de l'eau physiologique) une dose assez considérable de phosphate tricalcique (20 gouttes de notre émulsion), puis

après 1/4 d'heure de contact centrifugeons le précipité et lavons-le à maintes reprises à l'eau physiologique, jusqu'à ce que cette dernière ne contienne plus de sérum libre, ce que l'on vérifie comme dans l'expérience précédente. Le phosphate est ensuite remis dans un volume d'eau physiologique égal à celui du sérum avec lequel il avait été en contact. Nous obtenons ainsi une émulsion homogène, comme dans le cas du sulfate de baryum imprégné de sérum.

Introduisons dans un tube (t. 1) 1 c. c. de cette émulsion (phosphate-sérum); dans un tube 2 une quantité correspondante de phosphate neuf; diluée dans 1 c. c. d'eau physiologique, dans un tube 3, une très faible quantité (0,025 c. c.) de sérum et 1 c. c. d'eau physiologique. Ajoutons ensuite à chacun de ces 3 tubes, 1 goutte d'acide acétique. Le tube 3 ne présente aucune modification ; dans les tubes 1 et 2, une certaine quantité de phosphate se dissout, le reste demeurant en suspension. Après 1/4 d'heure, centrifugeons ces deux tubes, puis décantons les liquides obtenus. Ces liquides ne diffèrent entre eux que par ceci : l'un provient de la dissolution de phosphate neuf (t. 2), l'autre de la dissolution du même phosphate imprégné au préalable des substances dissociantes du sérum (t. 1). Si, comme nous le disions tantôt par la dissolution du phosphate auquel elles étaient fixées, nous avons remis ces substances en liberté, elles doivent être présentes dans le liquide du tube 1, de sorte que si nous introduisons à présent du sulfate de baryum, elles devront le dissocier comme le ferait du sérum. C'est, en effet, ce que l'on observe : ajoutons à ces deux liquides, ainsi qu'au tube 3, 4 gouttes de $BaSO^4$; il se sédimente rapidement dans le tube 2 (dissolution du phosphate neuf), tandis qu'il reste dissocié dans le tube 1 (phosphate-sérum redissous), ainsi que dans le tube 3. Des tubes témoins montrent que ni les eaux de lavage ni l'acide acétique n'ont la moindre action dissociante sur $BaSO^4$. On peut donc, en choisissant une poudre susceptible d'être dissociée par le sérum et facile à solubiliser, défaire la combinaison qui s'établit entre elle et les substances colloïdales du sérum qui la dissocient [1].

1. Notons que si, au lieu d'acide acétique, on emploie HCl, qui dissout la totalité du phosphate, on constate que $BaSO^4$ n'est pas maintenu dissocié dans le liquide provenant de la dissolution du phosphate imprégné de sérum ; mais il faut remarquer que $BaSO^4$ se sédimente aussi dans du sérum additionné de la même quantité de HCl. Cela tient donc simplement à ce que HCl empêche l'action dissociante du sérum.

Ces expériences montrent, nous semble-t-il, que tout au moins dans les cas qui nous ont occupé, les phénomènes d'agglutination (globules $BaSO^4$) et de dissociation (sérum $Ba\ SO^4$), d'aspect si différent ont cependant pour point de départ le même fait : l'affinité de la poudre pour les globules et les colloïdes du sérum. Quelle est la cause qui, dans des cas aussi voisins, détermine des phénomènes aussi opposés ? Nous n'essayerons pas de donner une raison définitive de cette dissemblance; nous nous contenterons d'émettre une hypothèse; nous avons du reste cherché à l'étayer par quelques faits. Puisqu'il est acquis qu'une adhésion se produit dans ces deux cas entre la poudre et les particules qui constituent soit l'émulsion de globules rouges, soit le sérum, on peut se demander si, lorsque les combinaisons dues à cette adhésion se sont produites, les propriétés respectives des éléments employés n'influencent pas la tournure que prend la réaction. $BaSO^4$, comme on le sait, ne demande qu'à se déposer, étant très sensible à l'action de la pesanteur. Or on le met en présence, d'un côté, de globules, c'est-à-dire de particules qui, elles aussi, se sédimentent, qui ne restent pas aisément en suspension ; nous pouvons supposer que la tendance de $BaSO^4$ à se sédimenter n'étant que médiocrement neutralisée par une tendance contraire des globules, l'influence du sulfate va prédominer et la combinaison $BaSO^4$-globules descendre rapidement au fond du tube. Au contraire quand on met $BaSO^4$ en présence de sérum, il rencontre les colloïdes de ce dernier, colloïdes extrêmement difficiles à précipiter; la tendance de $BaSO^4$ à se sédimenter sera donc ici contrebalancée par une influence opposée très prononcée; si celle-ci prévaut, la combinaison $BaSO^4$, ne se sédimentera pas, mais restera dissociée dans le liquide; c'est ce qu'on observe, ainsi qu'il a été dit plus haut.

Dans cette hypothèse, ce serait de l'issue d'une lutte d'influences opposées que dépendrait l'apparition de la dissociation de $BaSO^4$ par le sérum. S'il en est ainsi, nous pouvons chercher à modifier le résultat de cette lutte, en affaiblissant l'une ou l'autre de ces influences; c'est ce que nous nous sommes efforcé de réaliser.

On sait que lorsqu'on le chauffe à 60° — 65° le sérum passe par une série d'états transitoires dont l'aboutissant est la

coagulation en bloc. On peut éviter ce bloc en diluant au préalable le sérum; alors les albuminoïdes du sérum se coagulent encore par le chauffage, — plus ou moins complètement suivant le degré de dilution, — mais sans se prendre en masse. En laissant un quart d'heure, par exemple, dans l'eau bouillante, du sérum de cheval additionné de 3 fois son volume d'eau physiologique, on obtient un liquide blanchâtre où les albuminoïdes sont, tout au moins en grande partie, coagulées, sans former bloc; ce liquide est encore une véritable solution colloïdale; mais comparé à du sérum non chauffé, il représente une solution colloïdale dont les particules ont plus de tendance à s'agglomérer et à se sédimenter.

Préparons deux tubes, contenant la même quantité de $BaSO^4$, dans le même volume d'eau physiologique, puis ajoutons, à l'un d'eux, une dose déterminée de sérum dilué au 1/4 dans l'eau physiologique, non chauffé, et à l'autre un volume identique du même sérum dilué, mais porté au préalable 1/4 d'heure dans l'eau bouillante. $BaSO^4$, reste finement dissocié dans le premier tube, tandis qu'il forme dans le second des blocs, que l'on ne peut confondre avec la sédimentation spontanée de cette poudre dans l'eau physiologique sans sérum. Une fois cette agglutination faite et les amas déposés, on constate que l'aspect lactescent du liquide surnageant a diminué et, si on y ajoute une nouvelle dose de $BaSO^4$, on observe que corrélativement à cet éclaircissement du liquide, son pouvoir agglutinant a baissé. Quand $BaSO^4$ est agglutiné par le sérum chauffé, il y a donc soudure entre cette poudre et les substances colloïdales, auxquelles le sérum chauffé doit son aspect laiteux. Puisqu'il en est ainsi, on peut enlever à du sérum chauffé son pouvoir agglutinant, en le faisant agir sur des quantités suffisamment fortes de $BaSO^4$. En effet, amassons par centrifugation, au fond d'un tube, le sulfate contenu dans 4 c. c. de notre émulsion et rejetons le liquide surnageant; puis délayons le culot dans un mélange contenant 0,6 c. c de sérum de cheval et 1,8 c. c. d'eau physiologique (mélange porté au préalable pendant 15 minutes dans l'eau bouillante); après quelques minutes, centrifugeons à nouveau.

Le liquide surnageant est absolument limpide, sans action sur du nouveau $BaSO^4$, et ne blanchit plus à 100°, même

si on le laisse pendant une heure à cette température.

En résumé, nous avons vu que la dissociation du $BaSO^4$ par le sérum, et l'agglutination de cette poudre par les globules rouges ont comme point de départ le même phénomène : l'adhésion du sulfate des particules qui constituent le sérum et l'émulsion de globules. Nous avons émis l'hypothèse que le sort de la combinaison ainsi formée dépendait de l'intensité de la tendance à rester en suspension des particules unies au $BaSO^4$, et qu'en diminuant cette tendance nous parviendrions peut-être à rendre prépondérante l'influence de la poudre et à provoquer ainsi une agglutination là où nous avions une dissociation. L'expérience, comme nous venons de le voir, appuie cette supposition[1].

1. Nous rencontrons évidemment ici deux objections, qu'il nous paraît utile de combattre avant de nous avancer plus loin. On pourait en effet penser que les substances qui provoquent l'agglutination ou la dissociation de $BaSO^4$ suivant que le sérum a été chauffé ou non, ne sont pas les mêmes; et on pourrait croire que le chauffage a simplement fait apparaître le pouvoir agglutinant du sérum en détruisant les substances dissociantes de ce dernier. Il ne paraît pas en être ainsi. En effet, si on traite une certaine quantité de sérum frais dilué (5/10 c. c. + 1,5 c. c. d'eau physiologique) par de fortes doses de $BaSO^4$, on enlève, ainsi que nous l'avons dit tantôt, les substances dissociantes du sérum. Si on porte à 100°, pendant 1/4 d'heure, le sérum dilué ainsi traité, en même temps qu'un autre tube contenant le même sérum, mais non traité par $BaSO^4$, on voit ce dernier devenir absolument laiteux par coagulation des albuminoïdes, tandis que le premier ne blanchit pas ou à peine. Mis en contact d'une faible dose de $BaSO^4$, il ne l'agglutine pas ou extrêmement peu. En enlevant au sérum frais, par de fortes doses de sulfate, les substances qui dissocient ce dernier, on lui enlève en même temps la possibilité de devenir, par le chauffage, agglutinant pour cette poudre, c'est là une forte présomption pour que ce soit aux mêmes substances que le sérum doit d'agir différemment sur $BaSO^4$, suivant qu'il a été chauffé ou non.

On pourrait encore nous objecter que le pouvoir dissociant du sérum est conservé même après le chauffage de ce dernier, mais qu'il est masqué par les propriétés agglutinantes que développe le chauffage. Cela ne nous semble pas être exact. En effet, nous avons vu tantôt que l'on peut enlever au sérum chauffé ses propriétés agglutinantes en le traitant par de fortes doses de $BaSO^4$, mais on peut remarquer, en examinant nos chiffres, que cet épuisement est bien plus facile que celui du pouvoir dissociant du même sérum, non chauffé. Ainsi, tandis que 4 c. c. de notre émulsion de sulfate suffisent pour enlever à 2,4 c. c. de sérum au 1/4, chauffé à 100°, toute propriété agglutinante pour cette poudre, 10 c. c. de la même émulsion ne font qu'appauvrir le pouvoir dissociant de 2 c. c. du même sérum au 1/4, non chauffé. On pourrait donc, si les propriétés agglutinante et dissociante du sérum appartenaient à des substances différentes, enlever la première par une quantité assez faible de $BaSO^4$, tout en conservant la seconde. Traitons donc un volume déterminé de sérum chauffé par la quantité de sulfate justement suffisante pour en enlever le trouble; nous lui enlevons de la sorte tout pouvoir agglutinant, mais il est aisé de constater qu'il n'a pas retrouvé trace de sa propriété dissociante.

Nous pouvons donc admettre que c'est bien aux mêmes substances, modifiables par la chaleur, que sont dues les deux actions opposées du sérum sur $BaSO^4$.

S'il en est ainsi, l'agglutination de $BaSO^4$ et du sérum chauffé repose sur la diminution de l'état colloïdal de ce dernier, nous obtiendrons peut-être des phénomènes différents, suivant que nous mettrons en contact d'une même quantité de poudre tantôt une dose faible, tantôt une dose forte de sérum chauffé. Introduisons dans deux tubes des quantités identiques (4 gouttes de notre émulsion) de $BaSO^4$, puis ajoutons à l'un d'eux 0,95 c. c. d'eau physiologique et 0,05 c. c. de sérum chauffé; à l'autre 0,6 c. c. d'eau physiologique et 0,4 c. c. du même sérum. Nous obtenons une belle agglomération dans le premier tube (peu de sérum), tandis que la poudre reste dissociée dans le second (beaucoup de sérum). Il a donc suffi de remédier à l'affaiblissement que le chauffage détermine dans le pouvoir dissociant du sérum, en employant une plus grande quantité de ce dernier, pour obtenir de nouveau la dissociation de la poudre.

Non seulement une forte dose de sérum chauffé peut dissocier du $BaSO^4$ neuf, mais elle peut remettre en suspension fine du sulfate préalablement agglutiné par une faible quantité du sérum. Préparons deux tubes contenant chacun 0,95 c. c. d'eau physiologique, 0,05 c. c. de sérum chauffé et 4 gouttes de notre émulsion de $BaSO^4$; quand l'agglutination est complète, ajoutons à l'un d'eux (tube 1) 0,35 c. c. du même sérum chauffé et à l'autre (t. 2), 0,35 c. c. d'eau physiologique. Agitons énergiquement les deux tubes; tandis que l'agglutination persiste dans le tube 2, la poudre est finement dissociée dans le tube 1 ; celui-ci présente absolument le même aspect qui si on eût fait agir d'emblée sur les 4 gouttes de $BaOS^4$, 0,4 c. c. de sérum chauffé [1].

Quand le sérum a été chauffé 1/4 d'heure à 100°, après avoir été dilué dans 3 volumes d'eau physiologique, et qu'il est ainsi devenu opaque, il faut, pour obtenir la dissociation de $BaSO^4$, employer une forte dose de sérum chauffé. Cependant on peut chauffer à 100° du sérum dilué et lui conserver intact, ou peu s'en faut, son pouvoir dissociant; si nous diluons en effet le sérum non plus avec 3 volumes d'eau physiologique, mais avec 3 volumes

1. Signalons la ressemblance que présente ce fait avec l'observation de Henri et Mayer, qui ont vu que des amas résultant de l'agglutination réciproque de deux colloïdes de signe électrique contraire se redissolvent dans un excès de l'un ou de l'autre de ces colloïdes*.

* Henri et Mayer, *Soc. de Biol*, 1904, n° 19.

d'eau distillée, et si nous le chauffons 1/4 d'heure à 100°, il conserve presque complètement son pouvoir dissociant des poudres. Mais hâtons-nous de faire remarquer que, tandis que le sérum dilué d'eau physiologique est fortement blanchi, le sérum dilué d'eau distillée l'est à peine, c'est-à-dire que les albuminoïdes du sérum n'ont été coagulées que très incomplètement. Cette modification des albuminoïdes est donc indispensable, pour que, les colloïdes perdant suffisamment de leur tendance à rester en solution, l'influence contraire du sulfate de baryte puisse prévaloir et provoquer la formation de grumeaux. Et en effet, si nous chauffons pendant 1/4 d'heure du sérum dilué dans l'eau physiologique, à des températures variables : 55°, 70°, 85°, 100°, nous constatons que l'agglutination du $BaSO^4$ se fait par le sérum chauffé à 85° ou à 100°, tandis qu'il y a dissociation de la poudre quand la température ne s'est élevée qu'à 55° ou 70°. Or, le sérum chauffé à 70° n'a pas blanchi, tandis qu'à 85° le sérum dilué est devenu laiteux.

Tous ces faits montrent que lorsqu'on mélange $BaSO^4$ à du sérum, on obtient une agglutination des deux éléments ou une dissociation de la poudre par le sérum, suivant que l'état colloïdal de ce dernier est plus ou moins prononcé. Mais ces deux phénomènes, si différents, reposent sur le même fait : l'adhésion des colloïdes à la poudre, tout comme, dans un mélange de sulfate et de globules, ceux-ci se collent au sulfate. Les deux faits, d'aspect si contraire : agglutination des globules par les précipités chimiques, suspension de ces derniers dans le sérum, ont donc un point commun.

L'existence de cette adhésion du sérum avec les poudres, comme $BaSO^4$, rend aisée, nous semble-t-il, l'explication du rôle empêchant que ce colloïde joue dans l'agglutination des globules par ces poudres. Cette adhésion résultant évidemment d'une affinité entre ces poudres ($BaSO^4$, etc.) et le sérum, il nous suffit d'admettre que cette affinité est plus forte que celle qui cherche à unir globules et poudres. Ayant à choisir entre les globules et le sérum, les poudres optent pour le sérum.

Jusqu'ici nous avons simplement relaté les expériences que nous avons exécutées avec les poudres, les globules et le sérum, et indiqué les conclusions qui découlent des faits observés. Qu'il nous soit permis — bien que nous entrions peut-être ici dans le

domaine de l'hypothèse — de jeter un coup d'œil, en utilisant ce que nous avons appris au sujet des poudres, sur les phénomènes que l'on a constatés dans l'étude des substances colloïdales. V. Henri, Lalou, Mayer et Stodel[1] ont vu que si on mélange un colloïde, négatif par exemple, stable, c'est-à-dire peu impressionnable par les électrolytes, à un colloïde de même signe, instable, c'est-à-dire sensible aux sels, le mélange ne se précipite pas et devient même plus insensible aux électrolytes que ne l'est le colloïde instable. Quand les électrolytes parviennent à floculer le mélange, le précipité obtenu contient les deux colloïdes. Malheureusement, ce fait ne nous renseigne pas sur les rapports qu'ont entre eux les deux colloïdes pendant qu'ils sont en solution. On est tenté d'admettre que si le colloïde stable protège le colloïde instable contre l'action des électrolytes, c'est parce qu'il y a adhésion entre leurs particules. Cette protection d'un colloïde instable par un colloïde stable ressemble évidemment à la protection que le sérum exerce sur $BaSO^4$ contre l'action de la pesanteur. Nous avons montré que cette protection, qui amène une suspension de la poudre, relève précisément d'une adhésion de la poudre aux colloïdes du sérum. Aussi pensons-nous qu'il ne serait pas déraisonnable d'admettre que dans les mélanges de même signe électrique, la protection de l'instable par le stable relève aussi d'une adhésion des particules de ces deux corps. Il y aurait donc là adhésion comme dans les mélanges de deux colloïdes de signes opposés, mais tandis que dans ce dernier cas il se produit une floculation, celle-ci manque dans les mélanges de colloïdes de même signe.

L'adhésion se ferait ainsi entre les colloïdes, sans tenir compte de leur charge électrique ; suivant les cas, il se produirait ou non une floculation ultérieure. Mais cette floculation n'apparaîtrait plus comme la démonstration indispensable de l'adhésion des deux colloïdes ; l'absence de floculation ne pourrait plus être interprétée comme l'indice certain d'une absence d'adhésion entre les colloïdes. La précipitation de ceux-ci serait due à des facteurs dont un certain nombre paraissent actuelle ment connus (électrolytes, charges électriques contraires).

L'existence d'une telle adhésion expliquerait aisément un phénomène observé par Mme Girard-Mangin et V. Henri et qui

1. Henri, Lalou, Mayer, Stadel, *loc. cit.*

consiste dans l'obstacle apporté par de faibles quantités de sérum à l'agglutination des globules par les colloïdes, aussi bien négatifs que positifs [1]. Le sérum étant considéré comme un colloïde négatif, on comprend facilement qu'il s'oppose à l'action des colloïdes positifs sur les globules; car il flocule ces colloïdes comme tout colloïde négatif flocule les colloïdes positifs et inversement. Mais cette explication, dans la pensée de Mme Girard-Mangin et V. Henri, ne peut s'appliquer au cas des colloïdes négatifs, puisqu'ils ne sont pas précipités par le sérum. Se basant sur l'interprétation qu'ils ont donnée de l'agglutination des globules rouges par les colloïdes, interprétation que nous avons examinée dans la première partie de ce travail, ces auteurs ont expliqué le rôle empêchant du sérum sur le pouvoir agglutinant des colloïdes négatifs, par l'obstacle qu'apporte tout colloïde stable (sérum) à la floculation des colloïdes instables de même signe (négatif) par les électrolytes qui, dans le cas présent, sont les sels endoglobulaires diffusés des hématies.

Si l'hypothèse d'une adhésion entre les colloïdes stables (sérum) et instables de même signe, combinaison de même ordre que celle du sérum avec $BaSO^4$, est exacte, il suffit, pour expliquer l'entrave qu'apporte le sérum à l'agglutination des globules par les colloïdes instables négatifs, d'admettre que l'affinité des colloïdes pour le sérum l'emporte sur leur affinité pour les globules. Ce serait donc toujours pour la même raison que le sérum empêche l'agglutination des globules rouges, et par les colloïdes positifs qu'il flocule, et par les colloïdes négatifs qu'il ne flocule pas, et par $BaSO^4$ qu'il dissocie.

CONCLUSIONS

1° Certains précipités chimiques agglutinent, puis hémolysent les globules rouges lavés;

2° Cette agglutination a pour origine une action directe des précipités sur les globules, et inversement;

3° Il est probable que le pouvoir agglutinant des colloïdes sur les globules, doit avoir aussi pour base une action directe de ces éléments les uns sur les autres;

1. C'est évidemment là un fait analogue à celui que nous avions nous-même relaté dans notre première note, à savoir que le sérum empêche l'agglutination et l'hémolyse des globules par les poudres.

4° Le sérum empêche, même à petites doses, l'agglutination et l'hémolyse des globules par les précipités;

5° Le sérum frais maintient en suspension fine certains précipités, tels que le sulfate de baryum;

6° Dans cette dissociation de $BaSO^4$ par le sérum, il y a adhésion à cette poudre, des colloïdes albuminoïdes du sérum; cette dissociation de $BaSO^4$ par le sérum et l'agglutination de $BaSO^4$ par les globules ont donc un point initial commun : l'adhésion à la poudre de particules en suspension (globules, colloïdes du sérum). L'adhésion des albuminoïdes du sérum aux poudres qu'ils dissocient peut se démontrer notamment, soit par ce fait que les poudres qui ont été dissociées par du sérum, restent dissociées si on enlève tout excès de sérum, soit par cette circonstance que l'on peut, en employant des précipités convenables ($Ca^3 (PO^4)$), remettre en liberté les substances colloïdales qui s'y étaient attachées et les maintenaient en suspension;

7° Dans l'apparition d'une agglutination ou d'une dissociation du précipité, il semble que l'intensité avec laquelle les particules qui s'attachent à la poudre tendent à rester en suspension, joue un certain rôle;

8° Il est possible que, dans un mélange de deux colloïdes de même signe électrique, dont l'un est stable, l'autre instable, la protection que le premier exerce sur le second contre l'action floculante des électrolytes soit due à une adhésion réciproque des particules des colloïdes.

DE LA SYMBIOSE DU BACILLE TYPHIQUE AVEC D'AUTRES MICROBES

LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

Par le Dr J. ATLASSOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

DE LA SYMBIOSE DU BACILLE D'EBERTH AVEC D'AUTRES MICROBES

Le but que nous nous sommes proposé était de trouver les microbes qui favorisent le développement du bacille typhique, dans l'espoir de reproduire, avec leur concours, chez les animaux, la fièvre typhoïde expérimentale.

Pour résoudre cette question, il a fallu déterminer d'abord dans quelles conditions le bacille typhique ne poussait plus ou ne poussait que très faiblement. Si nous pouvions trouver des microbes favorisants qui permettraient au bacille typhique de cultiver, même dans ces conditions défavorables, la solution du problème que nous étudions serait peut-être facilitée.

On sait que le bacille d'Eberth se développe mal dans des milieux acides; il a donc fallu préciser les limites de l'acidité qui commencent à être incompatibles avec la vie du bacille typhique.

Les milieux employés étaient la gélose et la gélatine; cette dernière, à cause de sa transparence, permet d'apprécier des détails des cultures, d'autant plus qu'elle ne se trouble pas comme la gélose, après l'addition d'acides.

Pour acidifier nos milieux, nous nous sommes adressé à la solution normale d'acide chlorhydrique ($36^{gr},5$ de HCL pour 1 litre d'eau).

En faisant pousser le bacille typhique dans des milieux dont la teneur en acide augmentait de plus en plus, nous avons

constaté que la culture ne se faisait plus, lorsque la teneur en acide était de 0,0121 HCL pour 10 c. c. de milieu, soit de 0,121 0/0.

Ceci établi, nous nous sommes mis à ensemencer, dans des boîtes de Petri, simultanément le bacille typhique et différents autres microbes, tantôt en croix, tantôt en faisant des stries parallèles. Nous avons étudié de la sorte la symbiose du bacille d'Eberth avec les microbes suivants : *B. coli comm.*, *proteus vulgaris*, *staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. Friedländer*, *sarcina rosea*, *sarc. Palm.*, *sarcina flava*, *sarcina alba et torula.*

Sans entrer dans les détails de ces expériences, nous nous contenterons de formuler les conclusions auxquelles nous sommes arrivés.

1° Le *B. coli comm.* pousse bien avec le bacille typhique, mais souvent il empiète sur ce dernier; il donne encore des cultures dans des milieux dont l'acidité est de 0,1825 0/0 HCL et dans lesquels le bacille typhique ne se développe plus;

2° Nous avons constaté que la plupart des microbes cités plus haut n'avaient aucune influence quelconque sur la culture du bacille typhique;

3° Le bacille de Friedländer favorise un peu le développement du bacille typhique : *a*) ce dernier peut donner encore une culture, en présence du bacille de Friedländer, bien que le milieu ait atteint la limite d'acidité, soit 0,121 0/0; si celle-ci est dépassée, le bacille typhique cesse de cultiver, alors que le bacille de Friedländer continue à se développer, même dans un milieu contenant 0,1825 0/0 de HCL; *b*) lorsqu'on ensemence ces deux microbes en croix, on voit que le bacille typhique abandonne la strie suivant laquelle il devait se dévolopper, et suit celle du bacille de Friedländer dans ce dernier cas; il peut même pousser plus abondamment que lorsqu'il est seul;

4° L'action favorisante est surtout très nette pour la *torula rosea*. En présence de cette dernière, le bacille typhique supporte une acidité de 0,1825 0/0, parfois même de 0,243 0/0, soit double de celle qu'il est capable de tolérer étant seul. Le phénomène signalé pour le bacille de Friedländer est beaucoup plus prononcé dans le cas de la *torula*.

Nous avons étudié sous ce rapport plusieurs espèces de

torula, mises obligeamment à notre disposition par M. le Dr Binot de l'Institut Pasteur : T. Hansen, T. nigra, T. alba et T. rosea. Les meilleurs résultats de tous ont été obtenus avec la T. rosea ; vient ensuite T. alba, puis T. nigra ; T. Hansen exerce l'action la plus faible de toutes.

Les résultats de la symbiose deviennent manifestes après plusieurs jours, souvent après une semaine et plus.

Quel est le mécanisme de l'action favorisante de la *torula rosea?* Est-ce le changement de la réaction du milieu, est-ce l'influence favorable de ses produits de sécrétion, est-ce le changement de la constitution du milieu de culture, est-ce, enfin, que le microbe favorisant sert de substance nutritive au bacille typhique?

Dans l'impossibilité de résoudre ces questions, nous nous sommes proposé de voir seulement s'il ne s'agit pas ici d'un changement de réaction du milieu qui, d'acide, deviendrait alcalin.

Pour résoudre cette question, j'ai fait, sur le conseil de M. Metchnikoff, l'expérience suivante : profitant de ce que beaucoup de champignons transforment le milieu acide en milieu alcalin, j'ai ensemencé sur de la gélose acide (0,146 0/0 — 0,1825 0/0 — 0,243 0/0 HCL) le bacille typhique en même temps que les champignons suivants : *Aspergillus oryzæ*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium glaucum*. Ils ont tous donné des cultures sur gélose acide, sauf le *A. glaucus* qui ne pousse plus, quand l'acidité est de 0,1825 0/0 HCL. A partir du 5e jour, on pouvait constater, par le bleuissement du tournesol, l'apparition de la réaction alcaline, mais malgré cela le bacille typhique ne se développait pas ; or, ce dernier, ensemencé avec la *torula rosea* dans ces mêmes milieux, a donné une culture sans même que la réaction des milieux fût devenue alcaline. Ce n'est donc pas dans le changement de la réaction du milieu qu'il faut chercher la cause de l'action favorisante de la *torula rosea* sur le bacille typhique. Le même fait a été, du reste, observé par M. Metchnikoff au sujet du vibrion cholérique (2).

Cette action de la *torula* joue-t-elle aussi un rôle, au point de vue clinique ou épidémiologique? On sait que la torula est très répandue dans la nature (3) et (4). On la trouve très souvent dans l'estomac chez l'homme ; ainsi De Bary (5), sur 17 per-

sonnes examinées à Strasbourg, l'a trouvée dans 76 0/0 des cas; cette fréquence a été également constatée par Capitan et Moreau (6); Metchnikoff, en examinant le contenu stomocal chez l'homme, y trouvait plus souvent des *torula* que des sarciens (7). Une étude plus approfondie de cette question projetera peut-être une lumière sur la prédisposition de certaines personnes à la fièvre typhoïde, ainsi que sur d'autres problèmes d'ordre épidémiologique.

Nous passerons maintenant, aux expériences ayant trait à la fièvre typhoïde expérimentale chez les jeunes lapins.

Bien que l'agent de la fièvre typhoïde soit connu depuis plus de 20 ans, on est encore loin d'être fixé sur la possibilité de reproduire expérimentalement cette maladie. D'après certains auteurs, tels que Neufeld (8), Beumer et Peiper (9), Sirotinin (10), Ali-Cohen (11), Baumgarten (12) et d'autres, les lésions produites chez les animaux par l'injection du b. typhique ne sont pas spécifiques et peuvent être obtenues par n'importe quels autres bacilles, pourvu que l'on en injecte beaucoup. D'autres auteurs, qui ont cru pouvoir déterminer la fièvre typhoïde expérimentale chez les animaux, injectaient les bacilles typhiques sous la peau, dans le péritoine ou dans les veines, (Gilbert et Girod (13), Petruschky (14), Germano et Moreau (15), Pfeiffer et Kolle (16), Chantemesse et Widal (17), Sanarelli (18) et d'autres). Quel que soit du reste le mode d'injection, il est clair qu'il est très différent de celui qui s'observe chez l'homme. Le mode d'inoculation de choix est l'inoculation par la voie gastro-intestinale.

Il a été mis en usage seulement deux fois : d'abord, par Chantemesse et Ramond (19), puis, par Remlinger (20). Chantemesse et Ramond auraient obtenu des résultats positifs chez un macaque qu'ils avaient nourri avec un mélange de confitures et de bacilles typhiques, puis chez des lapins qu'ils avaient préalablement « humanisés » en leur injectant pendant 3 semaines du sérum humain et de l'urine. Les expériences de Remlinger sont plus simples. Ce savant a obtenu une affection mortelle chez les animaux, en leur donnant à manger des légumes souillés de cultures typhiques, après 2-3 jours de jeûne.

Rappelons ici les expériences de Metchnikoff sur le choléra. Après avoir démontré l'importance des microbes favorisants et

empêchants sur la culture du vibrion cholérique, il pensa que si l'on ne réussit pas à reproduire le choléra chez les animaux de laboratoire, en introduisant des vibrions dans leur tube digestif, cela devrait tenir à ce que les vibrions y rencontrent des microbes exerçant une action antagoniste. L'asepsie de l'appareil gastro-intestinal étant très difficile à réaliser, comme cela ressort des recherches de Stern (21) et comme cela a été plus tard confirmé par Strasburger (22) et d'autres, Metchnikoff eut l'idée de s'adresser aux lapins nouveau-nés dont la flore gastro-intestinale est très pauvre en microbes. Chez des lapins âgés de 8 jours, Tissier (23) n'a trouvé que des streptocoques et une espèce de diplocoques. L'expérience a fort bien réussi chez des jeunes lapins auxquels on fit avaler des cultures de choléra, surtout lorsqu'on ajouta des microbes favorisants.

Il y avait donc lieu de supposer que, pour la fièvre typhoïde expérimentale, il en serait de même, si les bacilles d'Eberth rencontraient des microbes antagonistes dans la flore bactérienne très riche de l'intestin. Guidé par cette considération, nous avons expérimenté sur de jeunes lapins et, pour plus de certitude, nous avons adjoint, dans la plupart des cas, aux cultures typhiques, la *torula rosea*.

Les cultures typhiques étaient d'abord introduites dans la bouche, suivant la technique de Metchnikoff, au moyen d'une baguette en verre avec laquelle on avait raclé la surface de la gélose; plus tard, je préparais une émulsion de bacilles typhiques que je faisais avaler aux jeunes lapins, au moyen d'une tétine en caoutchouc. Les deux procédés donnent de bons résultats.

Les cultures typhiques étaient toujours âgées de 24 heures; celles de *torula* étaient du même âge, la plupart du temps; ce n'est que dans des cas très rares que j'employais des cultures de *torula* âgées de 2-3 jours, quand celles de 24 heures étaient trop pauvres. Au cours de mes expériences j'ai eu à ma disposition quatre origines différentes de bacille typhique. La culture (A), dont je me suis servi au début, était peu virulente; la culture (B), âgée de 24 heures, tuait un cobaye de 300 grammes en 22 heures, en injection intrapéritonéale; elle n'était donc pas bien virulente non plus. La culture (C), que j'ai isolée du cœur du cobaye infecté avec (B), s'est montrée

plus virulente : 1/5 de culture de 24 heures sur gélose tuait un cobaye de 340 grammes en 16 heures, en injection intrapéritonéale. Les résultats les plus sûrs ont été obtenus avec cette même race, ayant fait deux passages par le cobaye. Cette culture, que nous appelons (D), tuait un cobaye de 310 grammes en 19 heures, à la dose de 1/5 de culture de 24 heures sur gélose, en injection intrapéritonéale. Les jeunes lapins recevaient toujours une culture entière et restaient pendant tout le temps auprès de leurs mères.

Première série d'expériences.

Le 10 juin 1903, on introduit *per os* chez 4 petits lapins, âgés de 10 jours, la culture typhique B, mélangée avec la *torula rosea*. Les animaux ne manifestent pendant plusieurs jours aucun symptôme morbide. Le 20 juin on leur administre un mélange de la culture C. et de *torula*. Les lapins résistent bien. Le 24 et le 26 juin on répète l'opération. Les lapins ne présentent rien d'anormal. Les résultats négatifs de cette expérience doivent évidemment être attribués à la faible virulence de la culture B.

Deuxième série d'expériences.

Le 8 juin on injecte *per os* un mélange de bacille typhique A et de *torula* à 5 petits lapins âgés de 7 jours. Le 11 juin on introduit chez trois autres lapins de même portée (âgés de 10 jours), par la même voie, un mélange de bacille typhique B et de *torula rosea*. Le 24 juin, tous les lapins (7), sauf un (n° 8), reçoivent un mélange de culture C + *torula*. Le 27 juin, les mêmes 7 lapins reçoivent une culture de bacille D + *torula rosea*. Ils n'accusent aucun signe de maladie. Le 29 juin, je les ai séparés de leur mère. Le lendemain j'ai trouvé 2 petits lapins morts. Nous décrirons plus loin les résultats de l'examen anatomo-pathologique et bactériologique; faisons seulement remarquer que chez ces 2 lapins l'estomac renfermait des aliments et les intestins étaient pleins, ce qui doit écarter l'hypothèse de la mort par inanition. Le 30 juin, au matin, nous avons remis les 6 lapins restants dans la cage de leur mère et à cinq d'entre eux (le n° 8, n'est pas infecté, il sert de témoin), nous avons fait manger un mélange de bacilles D et de *torula rosea*. Sur ces 5 lapins inoculés, un meurt dans la nuit du 1er au 2 juillet, 2 meurent le 4 juillet; le 7 juillet il en meurt encore un. Sur la totalité de 8 lapins, 6 sont morts; 1 a résisté à l'inoculation, ainsi que le n° 8, qui a servi de témoin et n'a pas été injecté.

Troisième série d'expériences.

Contrairement aux animaux de la série précédente, dans cette troisième série, l'inoculation avait été faite une seule fois. Le 29 juin, 7 lapins, âgés de 15 jours, reçoivent un mélange de b. typhiques D. et de *torula rosea;* déjà

trois jours après, le 2 juillet, un de ces lapins est mort; il pesait au moment de l'inoculation 270 grammes; après la mort, son poids était de 230 grammes. Le 4 juillet, deux autres lapins sont morts (250-240 grammes, 260-220 grammes). Le 5 juillet, il y eut encore deux morts; leurs poids étaient au moment de l'inoculation et après la mort : 240-230; 240-210 grammes. Tous ces animaux accusaient, après l'inoculation, un état de dépression profonde; ils restaient immobiles dans leur cage, leurs poils étaient hérissés, les yeux à demi clos; ils ne réagissaient presque pas aux influences extérieures. Ils rendaient des matières molles sans avoir de diarrhée, à proprement parler. Le 6 juillet, il y eut encore un mort (300-340 grammes). Le dernier lapin est mort le 8 juillet, après avoir augmenté de poids de 50 grammes (290-340 grammes).

Les expériences de la 2e et surtout de la 3e série montrent donc d'une façon certaine que l'on peut déterminer chez les animaux une maladie mortelle en leur introduisant des cultures virulentes dans le tube digestif.

Pour résoudre la question du rôle que joue la *torula rosea* dans cette maladie expérimentale de jeunes lapins, nous avons fait une quatrième série d'expériences.

Quatrième série d'expériences.

Le 9 juillet on introduit dans la bouche de trois lapins, âgés de 11 jours, une culture de b. typhique D. non additionnée de *torula*. Le 13 juillet, on trouve un des lapins mort; le lendemain, un autre est mort; le troisième a survécu.

Examen anatomo-pathologique et bactériologique des lapins. — Les lésions anatomo-pathologiques rappellent celles que l'on constate chez l'homme, mais elles présentent aussi quelques particularités. Le siège principal des lésions est le tube gastro-intestinal. On remarque tout d'abord des altérations dans l'intestin grêle, surtout au voisinage du gros intestin.

Il y a à ce niveau de l'hyperémie et des ecchymoses ponctuées, les plaques de Peyer sont augmentées, dans tous les cas, elles sont fortement hyperémiées et ont 9/10 de longueur sur 4/5 de largeur: ce qui frappe surtout, c'est leur épaississement; elles font saillie sur le tissu environnant beaucoup plus que cela n'a lieu chez les lapins normaux; dans les cas où la mort survenait au 6e ou 7e jour après l'inoculation, on a même pu observer des ulcérations au niveau des plaques de Peyer. Nous n'avons pas observé d'ulcérations très profondes, ce qui tient, évidemment,

à l'espèce animale employée, à l'âge des animaux et surtout à la courte durée de la maladie, celle-ci n'ayant jamais dépassé 10 jours; or, chez l'homme, les ulcérations typhiques commencent seulement à se former après le 10e jour. Nous devons signaler également des altérations du cœcum observées dans 11 cas sur 15 (73 0/0). Ces altérations se traduisent par une hyperémie intense des replis de cœcum, ainsi que par une hyperémie et des suffusions sanguines de son bout terminal. Dans un grand nombre de cas (53 0/0), nous avons constaté, au niveau de la muqueuse stomacale, une forte hyperémie et des suffusions sanguines assez étendues, ayant atteint dans un cas les dimensions d'une pièce de 10 francs; ce fut le cas chez un lapin de la 3e série, mort le 6e jour après l'infection; ces lésions étaient le plus prononcées au niveau de la grande courbure, près du pylore; parfois, il y avait également une hyperémie du duodénum. Dans trois cas (20 0/0), nous avons constaté de l'hyperémie du côlon.

La rate a été normale dans un cas seulement; dans tous les autres cas, elle était augmentée de volume, foncée, souvent de consistance friable. Le foie était également augmenté de volume, fortement hyperémié. Les poumons étaient normaux. Dans un cas, le liquide péritonéal était trouble (ascite); dans un autre cas, il y eut, en plus, une péricardite adhésive. Les reins étaient hyperémiés; la capsule s'enlevait facilement dans tous les cas. La vessie était tantôt pleine, tantôt vide. L'estomac renfermait toujours des aliments; le contenu intestinal était, dans la majorité des cas, de consistance molle, mais jamais liquide.

L'examen histologique des plaques de Peyer a montré que l'épithélium de la muqueuse manque et laisse à nu les couches sous-jacentes; la muqueuse et la sous-muqueuse sont très infiltrées; il y a des hémorragies; les replis du cœcum présentent des lésions analogues, avec cette différence que l'épithélium est conservé. Sur les coupes on voit un grand nombre de bacilles sous forme d'amas; ils sont situés dans la muqueuse et la sous-muqueuse; certains d'entre eux sont englobés par les phagocytes.

Dans tous les cas (15) qui s'étaient terminés par la mort, nous avons ensemencé en bouillon et sur gélose le sang, la rate, les parois intestinales et les plaques de Peyer; dans 3 cas, j'ai ensemencé, en plus, le foie. A l'examen du sang, nous avons

pu constater le b. typhique dans 12 cas; dans 2 cas, il était associé au bac. coli comm. Dans les 3 autres cas, le b. typhique a été constaté dans les parois intestinales (1 fois) et dans la rate (2 fois). Dans la rate, le b. typhique a été constaté 12 fois. Dans les parois intestinales et dans les plaques de Peyer, le bacille d'Eberth a été vu 9 fois.

Nous voyons donc que, chez tous les lapins morts, nous avons pu trouver le bacille typhique tantôt dans un organe, tantôt dans plusieurs à la fois. Nous pouvons donc affirmer qu'il s'agit, dans tous ces cas, d'une fièvre typhoïde expérimentale, à localisations gastro-intestinales.

Pour différencier le b. d'Eberth du colibacille, nous faisions des ensemencements dans du lait, sur gélose lactosée et tournesolée ; nous avions également recours à l'agglutination; à cet effet, nous nous sommes servi du sérum d'une chèvre immunisée contre le b. typhique; ce sérum nous a été fourni par le docteur Besredka, auquel nous exprimons ici notre vive reconnaissance. Un essai préliminaire nous a montré que ce sérum agglutinait le bacille typhique D. dans la proportion de 1 : 100,000, alors qu'il n'agglutinait le colibacille qu'à la proportion de 1 : 40; en nous aidant de ce réactif si sensible, ainsi que des deux milieux indiqués plus haut, nous étions à même d'éviter toute erreur.

Le rôle de la torula dans l'infection typhique. — Nous avons vu que la *torula* favorise le développement de b. d'Eberth. En est-il de même *in vivo?* Il suffit de comparer les expériences de la 3e et de la 4e série, pour répondre affirmativement. Dans la 3e série, où les animaux étaient infectés avec le mélange de b. typhique et de *torula*, nous avons pu constater des morts dès le 3e jour; de plus, tous les 7 lapins ont fini par succomber. Dans la 4e série, où l'inoculation fut pratiquée 2 fois avec la culture D. seule, sans addition de *torula*, la mort eut lieu le 7e jour, et sur 3 lapins, 1 a survécu. Si nous ajoutons à cela que les animaux de la 3e série étaient un peu plus âgés que ceux de la 4e série, ce qui est un facteur très important, le rôle de la *torula rosea* devient incontestable.

CONCLUSIONS

1. On peut déterminer chez les lapins une fièvre typhoïde expérimentale en introduisant des bacilles typhiques dans leur

tube digestif; il est nécessaire pour cela que les animaux soient très jeunes.

2. Les altérations anatomo-pathologiques de cette fièvre typhoïde expérimentale des jeunes lapins rappellent celles que l'on observe chez l'homme, surtout chez les enfants; les ulcérations profondes sont relativement rares.

3. Les différentes espèces de *torula*, et surtout la *torula rosea*, favorisent l'infection.

4. La fièvre typhoïde expérimentale, provoquée par l'introduction du virus dans le tube gastro-intestinal, se prête mieux à l'étude des questions de prophylaxie et de traitement que l'infection produite par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.

BIBLIOGRAPHIE

1) Kolle u. Wassermann, *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Jena 1902. — *Antagonismus und Symbiose in Mischkulturen*, I, Zief, p. 122.

2) Metchnikoff, Recherches sur le choléra et les vibrions, 4e mémoire, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.

3) Alb. Klocker, *Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis Alkoholgärungs gewerbe*, Stuttgart, 1900.

4) Prof. Dr Paul Lindner, *Mikroskopische Bertriebskontrolle in den Gärungsgewerben in die technische Biologie, Hefenreinkultur und Infektionslehre*, Berlin, 1901.

5) De Bary, *Archiv. für Exper. Pathol.*, V, XX, 1886, p. 243.

6) Capitan et Moreau, *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Soc. de Biologie*, 1889, p. 25.

7) Metchnikoff, *Recherches sur le choléra et les vibrions.*

8) Dr Neufeld, *Die Pathogenität des Typhusbacillus für Thiere*, VII, Zief, p. 229.

9) *Zeitschr. f. Hyg.* Bd I, s. 489, 1886; Bd II, s. 110 u 382, 1887.

10) Sirotinin, *Ibid.*, Bd I, s. 465, 1886.

11) Ali-Cohen, *Dissert.*, 1886.

12) Baumgarten, *Centralbl. f. Klin. Medic.*, 1887, nº 4.

13) Gilbert et Girard, *Gazette méd. de Paris*, 1891, nº 21.

14) Petrouschky, *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd XXXII, s. 261, 1892.

15) Germano et Maureau. *Ziegl. Beitr.*, Bd XII, s. 494, 1893.

16) Pfeiffer u. Kolle, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, Bd XXI, s. 203, 1896.

17) Chantemesse et Widal, Étude expérimentale sur l'exaltation, l'immu-

nisation et la thérapeutique de l'infection typhique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

18) Sanarelli, Étude sur la fièvre typhoïde expérimentale, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

19) Chantemesse et Ramond, Fièvre typhoïde expérimentale, *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Société de Biologie*, 1897, p. 719.

20) Remlinger, Fièvre typhoïde expérimentale par contamination alimentaire, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897.

21) *Zeitschr. f. Hyg.*, 1892, Bd. XII, p. 88.

22) *Zeitschr. f. Hyg.*, 1903, Bd. XLVIII, p. 491.

23) Metchnikoff, Les microbes intestinaux, *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1903, nº 7, p. 266.

QUELQUES NOTES SUR LA MORPHOLOGIE & LA BIOLOGIE

DU BACTERIUM ZOPFII (KURTH)

Par M. N. SWELLENGREBEL (d'Amsterdam)

Le bacterium Zopfii a été découvert et décrit pour la première fois par M. Kurth [1], qui le trouva dans le contenu intestinal d'une poule. M. Kuhn [2] isola ce bacille de matières putréfiées. M. Günther [3] le trouva dans une saucisse. M. Berlioz [4] remarque qu'on l'a trouvé aussi, dans le sang de canards, dans la terre et dans l'eau. Je l'ai trouvé dans du lait insuffisamment stérilisé. Il me semble donc qu'on est justifié de conclure que ce bacille s'associe à la plupart des procès de putréfaction.

Dans les grands ouvrages de bactériologie, on n'est pas d'accord sur les propriétés de B. Zopfii. D'ailleurs il n'a pas été l'objet de beaucoup de recherches. On l'a confondu souvent avec B. Zenkeri, B. vulgare et B. vulgare β mirabilis. Sans doute, B. Zopfii ressemble beaucoup à ces autres espèces, mais il s'en distingue par des propriétés constantes, et par conséquent, il faut le regarder comme une espèce bien marquée. Ce bacille se distingue de B. vulgare par la propriété de ne pas liquéfier la gélatine, et de B. Zenkeri, avec lequel il jouit de la même propriété par l'aspect caractéristique de la culture en piqûre et sur plaques de gélatine.

Propriétés morphologiques. — Bac. Zophii est un bâtonnet de 2-5 μ sur 0,1-1 μ. Les bâtonnets sont réunis en longues chaînes ondulantes, dans lesquelles on ne peut souvent plus retrouver les différents individus. Le bacille est très mobile, grâce à de nombreux cils péritriches, qu'on peut apercevoir facilement, quand on les a colorés d'après les méthodes de Löffler ou de Bunge. Le bacille lui-même se colore facilement d'après les méthodes ordinaires, il prend le Gram, et il est aussi colo-

1. *Botanische Zeitung* 1883.
2. *Archiv für Hygiene*. Tome XIII n° 1.
3. *Archiv für Hygiene*, XXVIII, p. 153.
4. *Précis de bactériologie médicale*, p. 530. Paris, Masson, 1903.

rable d'après la méthode du médecin danois Claudius. (On colore une minute avec le violet de méthyle, puis on décolore par l'acide picrique et l'on traite par l'huile de girofle.)

Le bacille, cultivé pendant environ sept jours sur l'agar-agar, commence à produire des formes d'involution : des individus longs, gonflés irrégulièrement, à forme de massue, qui se divisent plus tard en particules minces. D'abord ces formes d'involution sont parfaitement colorables d'après la méthode de Claudius, plus tard elles ne conservent plus la couleur.

MM. Lehmann et Neumann[1] et M. Günther[2] disent que B. Zopfii ne produit pas de spores. M. Berlioz[3] affirme au contraire, que ce bacille forme des spores ovoïdes de la même largeur que le bâtonnet lui-même, et qui sont situées à l'extrémité renflée du bâtonnet. J'avais déjà vu très souvent, dans les formes d'involution, des taches claires incolorables, mais j'avais cru qu'elles étaient la suite d'une plasmolyse ou d'une dégénération. Cependant, j'ai réussi à colorer ces taches d'après la méthode de Möller (bain d'acide chromique, fuchsine de Ziehl-Neelsen, décoloration par l'acide sulfurique, coloration des bacilles au bleu de méthylène). Il était donc possible que ces taches fussent des spores réelles. Pour résoudre cette question, j'ai ensemencé des bacilles, qui contenaient les corpuscules que je prenais pour des spores, sur des plaques d'agar-agar. Celles-ci furent mises à l'étuve à 26° pendant 5 heures. Après ce temps, dans le cas ou ces formations seraient des spores, on pouvait s'attendre à voir celles-ci commencer à germer. J'ai donc fait des préparations de cultures toutes les deux heures, et je les ai colorées d'après la méthode de Möller : on pouvait aisément suivre les phases de la germination, en comparant les différentes préparations. Les spores se crevassaient à l'un des pôles, ce qui permit à l'individu jeune de sortir. La membrane de la spore restait le plus souvent adhérente au bâtonnet nouveau-né, même quand celui-ci commençait à se multiplier. La membrane de la spore, après la germination, ne conservait pas toujours la couleur rouge : quelquefois elle fut décolorée par l'acide sulfurique et se montrait par conséquent teinte en bleu. Ceci n'est

1. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie München*. J. F. Lehmann, 1904.
2. *Einführung in das Studium der Bakteriologie*. G. Thieme, Leipzig, 1902.
3. *Loc. cit.*

pas d'accord avec la remarque de M. Alfr. Fischer [1] qui affirme que la membrane de la spore conserve sa propriété de ne pas se décolorer dans les acides, même après la germination.

Propriétés culturales. — En ce qui concerne les propriétés culturales de B. Zopfii, les auteurs ne sont pas toujours d'accord, mais ils s'accordent tous sur le mode de développement sur plaques de gélatine. Aussi cette culture est très caractéristique, et elle fournit une des propriétés les plus importantes de ce micro-organisme. Les colonies ont des noyaux blancs, d'où rayonnent plusieurs minces rejetons. Observant ces colonies au microscope, par exemple à 105 : 1, on remarque une partie centrale opaque, d'où rayonnent les rejetons, qui sont composés à leur tour de petites colonies rondes ou ovales, transparentes et de couleur jaunâtre. Elles sont situées l'une auprès de l'autre, en formant ainsi de longues chaînes. Parmi ces chaînes, on observe des « spirulines » : des paquets de fils ondulants ou étendus. M. Berlioz [2] affirme que B. Zopfii ramollit la gélatine, puis la liquéfie lentement. Je n'ai jamais pu constater aucune trace de liquéfaction ; MM. Lehmann et Neumann [3] et M. Günther [4] disent que la liquéfaction n'a jamais lieu.

Quant à la culture par piqûre dans la gélatine, les témoignages des auteurs diffèrent considérablement, MM. Lehmann et Neumann [3] affirment que les bacilles se développent très bien, le long de la piqûre, et qu'ils produisent des rejetons transversaux dans la gélatine. A la surface le développement a lieu sous la forme d'une mince voile, où on observe souvent de fins fils qui s'étendent dans le voile. M. Günther [4], au contraire, nie que le développement ait lieu le long de la piqûre et dit que ces bacilles ne croissent que sur la surface de la gélatine. M. Berlioz [2] est d'accord avec MM. Lehmann et Neumann, en ce qui concerne le développement au-dessous de la surface. J'ai fait plusieurs cultures par piqûre en gélatine, mais je ne pouvais d'abord constater que le développement à la surface. Ceci ayant lieu à la température de la chambre, j'ai mis mes cultures à l'étuve à 22°. Alors le développement eut lieu aussi le long de la piqûre, d'après le mode précédemment décrit.

1. A. Fischer, *Vorlesungen über Bakterien*, p. 40. Jena, G. Fischer.
2. *Loc. cit.*
3. *Loc. cit.*
4. *Loc. cit.*

La culture en plaques d'agar-agar montre des variations considérables dans le mode de développement, MM. Lehmann et Neumann[1] indiquent qu'à l'œil nu, elle se montre comme une petite colonie d'un blanc grisâtre, aux rejetons minces et innombrables, puis s'entoure graduellement d'une zone transparente.

Peu de temps après, toute la surface est couverte d'un voile grisâtre. Regardée à un grossissement de 50 elle a l'aspect d'une pelote de fils très minces aux ramifications multiples. D'abord elle se colore en jaune, puis en jaune brunâtre. Je pouvais constater deux types : l'un était identique à celui de MM. Lehmann et Neumann, l'autre était plus robuste, quoique de même construction. Quand on ensemençait de ces deux types sur agar-agar incliné, les bacilles provenant des deux types se développaient de la même manière : une couche mince et transparente où se répandaient des fils fins. Ce mode de développement sur l'agar-agar incliné est d'accord avec les observations de MM. Lehmann et Neumann, seulement ces auteurs remarquent que la production des fils n'a lieu que très rarement, tandis que dans ma culture, elle était la règle.

La culture en bouillon présentait de grandes variations, selon la température. M. Berlioz remarque que le bouillon se trouble et qu'il se forme un voile mince et fragile. MM. Lehmann et Neumann, au contraire, affirment que le bouillon reste absolument clair et qu'il ne se forme pas de voile, mais un sédiment faible.

J'ai reconnu que le bouillon ne se trouble pas quand on l'a mis à la température de la chambre et il n'y avait point de voile, mais seulement un sédiment; ceci est donc d'accord avec le témoignage de MM. Lehmann et Neumann; quand on met la culture à l'étuve à 26°, il se forme un voile quelquefois très mince, quelquefois plus épais, qu'on peut aisément détruire en agitant l'éprouvette. Une fois le voile détruit, il ne se reforme plus. Je n'ai observé dans aucune circonstance que le bouillon se troublât. La réaction est alcaline. M. Günther remarque que le développement dans le bouillon devient de plus en plus faible quand la température s'accroît et qu'on ne peut plus le constater à une température de 30°. Je n'ai pu observer cette propriété

1. *Loc. cit.*

de B. Zopfii, au contraire : le développement se faisait à 30°, aussi bien qu'à la température de la chambre.

Les témoignages des auteurs sur le mode de développement sur pommes de terre et dans le lait s'accordent parfaitement. Mes cultures démontrèrent aussi les mêmes propriétés : sur pommes de terre, il se forme un voile d'un blanc grisâtre, qui ne couvre pas toute la surface de la pomme de terre. Dans le lait il ne s'opère pas de coagulation et la réaction ne change pas.

J'ai aussi essayé de cultiver B. Zopfii dans le liquide nutritif de Fraenkel et Voges [1] (on dissout dans un litre d'eau : chlorure de sodium, 5 gr.; phosphate de soude, 2 gr.; lactate d'ammoniaque, 6 gr.; asparagine, 4 gr.) Dans ce liquide, le bacille poussait à merveille, formant de petits flocons blanchâtres, quoique le liquide n'ait pas été neutralisé, comme on le fait généralement.

Propriétés biologiques. — Les témoignages des auteurs sont très différents, en ce qui concerne le développement de B. Zopfii en bouillon, contenant du glucose ou du lactose. M. Günther [2] affirme que la réaction ne change ni dans le bouillon glucosé ni dans celui lactosé, qu'il ne se forme pas de gaz et que le développement ne se fait qu'assez faiblement dans ces liquides. MM. Lehmann et Neumann, au contraire, observèrent que ce bacille produit de l'acide dans le bouillon glucosé. Ils eurent besoin de 0,25 c. c. d'une solution normale de KOH pour neutraliser l'acide qui s'était formé dans 100 c. c. de bouillon. Ils ne recherchèrent pas l'action de B. Zopfii sur le lactose. J'ai ensemencé ce bacille dans les bouillons à 2 0/0 de glucose et à 2 0/0 de lactose et j'ai mis ces cultures à l'étuve à 26°. Après cinq jours, j'eus besoin de 1,46 c. c. de solution normale de KOH pour neutraliser l'acide de 100 c. c. de bouillon glucosé et 0,625 c. c. de cette solution pour le bouillon lactosé. Le développement avait été fort abondant; le bouillon glucosé s'était troublé et manifestait une odeur fétide, le bouillon lactosé était resté clair; mais il y avait dans le liquide des flocons blanchâtres. J'avais aussi mis ces bouillons dans des tubes de verre, recourbés pour démontrer la production de gaz, s'il y

1. *Hygienische Rundschau*, 1894.
2. *Loc. ct.*

en avait. Il ne s'en produisit pas, mais il se manifesta une différence marquée entre le développement en bouillon glucosé et en bouillon lactosé. Dans le premier, le bacille poussait aussi dans la partie fermée du tube, tandis que dans le bouillon lactosé, il ne se développait que dans la partie ouverte : dans ce premier milieu le bacille pouvait donc mieux se passer d'air que dans le second.

M. Günther[1] remarque que B. Zopfii ne produit pas d'indol, M. Kuhn[2] n'en a pas observé non plus. MM. Lehmann et Neumann[3] réussirent à en démontrer la présence. Je crois que la propriété de ce bacille de former de l'indol est très variable et dépend des circonstances extérieures; la chaleur surtout favorise cette production. J'ai mis deux éprouvettes de bouillon pendant sept jours à la température de la chambre. Après ce temps, la réaction de l'indol ne se produisait pas. Alors j'ai mis deux éprouvettes pendant sept jours à l'étuve à 26° : la réaction se montra positive, quoique d'intensité différente. Puis j'ai répété la première expérience avec le même résultat négatif, et ensuite la deuxième avec une réaction positive et une négative. Une culture de sept jours (26°) dans une solution de peptone (2 0/0) donna une réaction fortement positive.

B. Zopfii produit une grande quantité de nitrite dans un milieu contenant un nitrate. Je l'ai ensemencé dans du bouillon contenant du nitrate de soude et j'ai mis cette culture à l'étuve à 26° en présence d'une éprouvette de contrôle. Après sept jours, l'une des deux cultures se colora très vivement en bleu brunâtre, avec la solution d'iodure de potassium amidonée additionnée d'acide sulfurique à 5 0/0, l'autre resta tout à fait incolore.

La production de H^2S par B. Zopfii est très variable, tantôt il en produit une assez grande quantité, tantôt il en produit si peu qu'on ne peut le mettre en évidence. Pur démontrer la présence de H^2S, je me suis servi de la méthode d'Ernst (culture en gélatine à tartrate de fer) qui est très sensible. L'addition de thiosulfate de soude ou de nitrite de soude n'augmentait pas la production de H^2S, mais le soufre libre la rendait plus abondante; quand on avait mis un peu de soufre dans la

1. *Loc. cit.*
2. *Loc. cit.*
3. *Loc. cit.*

gélatine, celle-ci, cultivée à 26°, s'était déjà colorée en noir le jour suivant.

Dans l'urine, le développement est très marqué. Il se forme une grande quantité de carbonate d'ammoniaque. La surface est couverte d'un voile assez épais ; le liquide se trouble.

J'ai observé aussi le mode de développement dans plusieurs milieux nutritifs, décrits par M. Alfred Fischer[1]. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau ci-dessous. Afin de pouvoir comparer la manière dont B. Zopfii et B. vulgare se comportent envers ces milieux nutritifs, j'ai mis les résultats des expériences de M. A. Fischer pour B. vulgare à côté des miens.

Nº de l'expérience.	SOLUTION DE 1 0/0 DE		REMARQUES	B. Zopfii.	B. vulgare.
	Pour fournir l'Az.	Pour fournir le C.			
I....	Peptone.	Saccharose.	Trouble léger. Sédiment. Point de voile.	3	3
II...	—	Peptone.	Trouble léger. Sédiment. Point de voile.	3	3
III ..	Pept. + KNO^3.	—	Trouble irrégulier. Sédiment. Point de voile.	3	3
IV...	Asparagine.	Saccharose.		0	1?
V...	—	Asparagine.		0	0
VI...	Tartrate d'ammoniaque.	Glycérine.	Développement faible.	2	0
VII..	Tartrate d'ammoniaque.	Acide tartrique.		0	0
VIII.	Nitrate de soude.	Glycérine.		0	0
IX...	Sulfate d'ammoniaque.	CO^2 de l'air.	Développement très faible en forme de fils.	1 ?	0
X ...	N. de l'air.	Saccharose.		0	0

3 = Développement abondant.
2 = Développement moins abondant.
1? = Développement qu'on peut à peine constater.

B. Zopfii produit, dans une culture en bouillon, du protéinochrome, qu'on peut aisément démontrer d'après la méthode de

1. *Loc. cit.*

MM. Erdmann et Winternitz[1] (ajouter à la culture une solution aqueuse de chlore ou de brome), la culture se colore en violet clair.

Place du Bacterium Zopfii (Kurth) *dans les différents systèmes bactériologiques.* — Sans doute B. Zopfii accuse quelque parenté avec B. vulgare. Ce dernier bacille a un caractère plus purement saprophyte et décompose plus énergiquement les matières organiques, ce qui se démontre par le développement insignifiant de B. vulgare dans un milieu dépourvu d'albumine, par la production plus grande de H^2S et d'indol, par la liquéfaction de la gélatine, etc. Hauser a démontré que Bacterium vulgare B. mirabilis, qui ne liquéfie la gélatine que très lentement, et Bacterium Zenkeri, qui ne la liquéfie pas et ne produit que peu de H^2S, ne sont que des races de B. vulgare, qu'on peut transformer l'une en l'autre à son gré. Par cette propriété, la ressemblance de B. vulgare et B. Zopfii devient plus étroite encore.

Dans le système de Hüppe[3], les bâtonnets sont divisés en deux genres : 1° Bacterium (point de production de spores); 2° Bacillus (production de spores). Puisque B. Zopfii produit des spores, il faut ranger ce bacille sous le genre Bacillus ; ainsi B. Zopfii et B. vulgare sont séparés l'un de l'autre dans ce système, ce qui n'est pas d'accord avec leur parenté évidente.

Dans le système de M. Migula[4], on divise les bâtonnets en trois genres : 1° Bacterium (point de cils); 2° Bacillus (cils diffus); 3° Pseudomonas (cils polaires); la parenté est donc exprimée plus clairement ; il en est de même avec le système de M. Macé[5], où les genres Bacterium et Bacillus sont réunis en un seul : Bacillus. Ainsi on ne fait attention ni à la production de spores ni aux cils, ce qui offre l'avantage de n'être pas obligé de changer la place qu'occupe un bacille dans le système, aussitôt qu'on a découvert des cils ou des spores chez ce bacille.

C'est dans le système de M. A. Fischer[6] qu'on met le mieux en évidence l'alliance entre B. vulgare et Zopfii. Cet auteur divise les bâtonnets (famille des Bacillacées) selon leur forme

1. *Münchener mediz. Wochenschrift*, 1903, n° 23. *Ref. Centralbl. f. Bakt.*
2. *Centralbl f bakt.* Tome XII, p. 360.
3. *Die Formen der Bakterien.*
4. *System der Bacterien.*
5. *Traité de bactériologie.*
6. *Loc. cit.*

extérieure en trois sous-familles : 1° Bacillacées (bâtonnets qui ne se changent pas en formant des spores et ceux chez qui on n'a pas encore découvert de spores); 2° Clostridiacées (bâtonnets adoptant la forme du clostridium butyricum en formant les spores); 3° Plectridiacées (bâtonnets adoptant la forme de Bac. tetani en formant les spores). Il divise la sous-famille des Bacilliacées en 4 genres : 1° Bacillus (immobile); 2° Bactrinium (cils monotriches); 3° Bactrillum (cils lophotriches); 4° Bactridium (cils péritriches). Dans ce système-ci, on réunit B. Zopfii et B. vulgare (B. mirabilis et Zenkeri) dans le même genre : Bactridium, qui est plus restreint que dans tout autre système et ainsi l'alliance est fort bien mise en évidence. Selon la nomenclature de ce système, il faut donc désigner Bacterium Zopfii (Kurth) sous le nom de Bactridium Zopfii (A. Fischer.)

Le gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.

8me ANNÉE DÉCEMBRE 1904 N° 12

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR l'Assimilation de quelques substances ternaires PAR LES VÉGÉTAUX A CHLOROPHYLLE

Par MM. P. MAZÉ et A. PERRIER

I

Les nombreuses recherches suscitées par la théorie minérale de Liebig avaient abouti, il y a environ un demi-siècle, à une conception très simple de la nutrition des végétaux à chlorophylle ; on peut la résumer en quelques mots : la plante verte tire tout son carbone du gaz carbonique, son azote et ses cendres des substances minérales du sol.

Les matières organiques désignées sous le nom d'humus ne participent pas à son alimentation ; elles doivent être préalablement minéralisées ; en d'autres termes, le carbon doit être transformé en gaz carbonique ; l'azote en acide nitrique ou en ammoniaque, l'hydrogène en eau, le soufre en acide sulfurique, le phosphore en acide phosphorique, etc.

En réalité, la pratique semble confirmer pleinement cette conception ; on sait bien aujourd'hui qu'un sol est fertile en raison de la quantité de substances minérales assimilables qu'il renferme ; les cultivateurs règlent leur intervention sur ces indications ; l'humus, dans lequel on voyait autrefois l'unique source de fertilité, ne doit être considéré que comme une réserve qui devient peu à peu assimilable et un élément qui concourt à donner à la terre des qualités physiques et chimiques favorables à la végétation.

Mais, malgré tous les arguments qui plaident en sa faveur, cette théorie n'a pas été acceptée longtemps sans réserves par les physiologistes et les agronomes : elle est trop exclusive. Sans nier l'influence capitale des substances minérales sur le développement des végétaux, ils se sont demandé si les matières organiques du sol ne peuvent pas concourir à leur alimentation dans une proportion plus ou moins sensible suivant les circonstances.

Cette idée s'est affirmée surtout quand on a vu les sucres et quelques alcools polyvalents former directement de l'amidon, à l'obscurité, dans les feuilles séparées ou dans les plantes entières. Les sucres peuvent donc pénétrer par les racines dans les végétaux et, une fois qu'ils circulent dans la sève, on ne saurait leur attribuer un autre rôle que celui qui est dévolu aux mêmes substances issues plus ou moins directement de la synthèse chlorophyllienne.

Il restait donc à montrer qu'une plante, cultivée dans une solution nutritive additionnée d'un sucre, absorbe régulièrement ce corps, même à la lumière. Bien des essais ont été tentés dans cette voie; parmi les résultats enregistrés, tous ceux qui n'ont pas été obtenus dans des milieux débarrassés des microorganismes sont sujets à caution ; mais des recherches récentes ont établi, en tenant compte de cette condition essentielle, que les végétaux supérieurs peuvent assimiler les sucres et la glycérine.

C'est ce qui ressort en particulier des expériences de M. J. Laurent [1] ; mais si l'on considère les poids à l'état sec des plants de maïs obtenus au bout d'un temps relativement long, on peut s'étonner de les trouver si faibles. Les poids les plus élevés enregistrés par M. J. Laurent, sont : 1° $0^{gr},682$ au bout de 31 jours ; 2° $1^{gr},186$, au bout de 62 jours.

Si l'on admet avec M. J. Laurent que la liqueur de Detmer est très favorable au développement du maïs, on est obligé de conclure que l'introduction du sucre dans la solution gêne l'évolution de la plante à la lumière et que son assimilation, bien que réelle, porte atteinte aux lois de la nutrition de la cellule végétale ; mais nous pensons que c'est plutôt le liquide

1. J. Laurent. Thèse présentée à la Faculté des sciences de Paris, 1903.

Detmer qui ne réalise pas les conditions favorables à la végétation.

Le rôle efficace du sucre qui pénètre par les racines ne saurait être mis en doute; mais, pour le prouver, il faut montrer que les plantes cultivées en présence de sucre fournissent un poids de substances sèches plus élevé que des plantes témoins cultivées dans la même solution minérale non additionnée de sucre. Les témoins doivent en outre se développer aussi vigoureusement que des plantes de même âge, cultivées dans un sol très fertile. Si on réalise ce double but, on aura le droit de conclure que les matières organiques solubles du sol peuvent concourir à l'alimentation carbonée des végétaux et contribuer à augmenter les poids des récoltes. C'est là une des questions que nous nous sommes posées; on verra de quelle façon nous l'avons résolue.

Dans le même ordre d'idées, nous avons examiné aussi l'influence d'un certain nombre d'autres substances ternaires sur la végétation, telles que la glycérine, l'alcool éthylique, l'alcool méthylique, la paraldéhyde; nous avons enfin étudié l'action de ces divers corps sur la germination. Nous exposerons donc successivement, l'action de ces substances sur la germination du maïs, sur son développement à l'obscurité, sur son développement à la lumière. Dans le cours de ces recherches nous avons eu l'occasion de faire quelques observations sur la chlorose du maïs, nous les résumerons également dans ce mémoire.

II

MARCHE DE LA GERMINATION EN PRÉSENCE DES SUCRES, DE LA GLYCÉRINE, DE L'ALCOOL MÉTHYLIQUE, DE L'ALCOOL ÉTHYLIQUE ET DE PARALDÉHYDE.

Dans tous nos essais, nous nous sommes servis exclusivement du maïs (variété jaune gros) ; les graines que nous avons utilisées provenaient entièrement de nos récoltes ; lorsque nous avons mis en expérience des séries de plantes, celles-ci provenaient toutes du même épi ; nous avons éliminé ainsi autant que possible, les influences individuelles. Il est en outre superflu d'ajouter que toutes nos cultures ont été faites dans des milieux préalablement stérilisés avec des graines débarrassées de germes

microbiens par un procédé que l'un de nous a déjà indiqué, mais que nous rappelons brièvement [1].

On sait que la germination s'effectue à l'abri des microbes, dans l'eau distillée aussi bien que dans les solutions additionnées de substances minérales[1]. C'est donc l'eau distillée qu'il faut prendre comme milieu de comparaison, si l'on veut mettre en évidence les différences attribuables aux substances introduites dans l'eau de germination.

On constate ainsi qu'à la température de 30°, le dextrose employé à une concentration de 4 0/0 retarde la germination de 4 à 5 jours; avec la glycérine à 2 0/0, le retard est encore plus sensible; nous avons fixé ces différences par la photographie (pl. VII.)

En présence d'alcool éthylique à 1 0/0, le retard est de même ordre qu'avec la glycérine; l'alcool méthylique à 0,7 0/0 agit comme l'alcool ordinaire; la paraldéhyde à 1 0/00 retarde également la germination du maïs, mais elle ne l'empêche pas, et,

1. Le procédé auquel nous avons eu recours, consiste essentiellement en un lavage mécanique des graines. Celles-ci recueillies avec soin, conservées dans un endroit sec, à l'abri des poussières, sont débarrassées des parties rugueuses au moyen d'un scalpel flambé, lavées ensuite à l'alcool absolu, puis agitées pendant 10 minutes avec du sable de Fontainebleau très fin, contenu dans un flacon avec un peu d'eau stérilisée. Après cette opération dont le but est d'enlever les germes adhérents, les graines sont lavées avec de l'eau stérilisée, puis immergées pendant 15 minutes dans du sublimé au 1/1,000.

Cette immersion seule, même prolongée, n'est pas suffisante pour stériliser les graines. M. Geppert a montré * en effet, en reprenant les expériences de Koch ** sur le pouvoir antiseptique du bichlorure de mercure, que celui-ci agit surtout par la quantité introduite dans le milieu de culture, quantité suffisante pour arrêter le développement des germes. Lorsqu'il précipite le mercure ainsi transporté, par le sulfhydrate d'ammoniaque, la spore de la bactéridie charbonneuse, peut se développer malgré un séjour prolongé de 24 heures dans le sublimé, au 1/1000. Le bichlorure de mercure ne peut donc être employé seul pour la stérilisation des graines, puisqu'il n'est efficace que dans des conditions qui gênent également le développement de l'embryon.

Après leur sortie du sublimé, les graines subissent 4 à 5 lavages à l'eau distillée stérile, puis sont distribuées au moyen d'une pince flambée, dans des tubes à essai également stérilisés. Elles reposent sur de faibles tampons de coton, qui, placés à la surface de l'eau distillée, les maintiennent dans un état d'humidité convenable pour la germination (planche VII).

Lorsque les tiges ont atteint 15 à 20 centimètres de longueur, on les place dans des flacons à col étranglé, munis d'un fort tampon de coton. Ces flacons, d'une contenance de 2 à 3 litres (planche VIII), sont remplis d'une solution nutritive stérilisée à 120°. Ils portent une petite tubulure latérale fermée avec du coton qui permet l'introduction du liquide pendant toute la durée de l'expérience sans toucher à la fermeture principale. Il est très facile de vérifier la pureté des cultures.

* GEPPERT. *Sur la question des antiseptiques*, Berl. Klin. Woch., 36, 1889.

** KOCH. *Mitteilungen a. d. K. Gesundh.*, t. I, p. 234.

chose assez curieuse, l'évolution des plantules est normale en présence de ces diverses substances ; si l'on ne considère que le sucre et la glycérine, le fait n'a rien qui doive nous étonner ; on sait en effet, depuis les recherches de Van Tieghem, de Brown et Morris, que les embryons végétaux, ou les plantules en germination, peuvent emprunter leurs aliments soit à des albumens artificiels, soit à des solutions de sucres sur lesquelles on les cultive ; l'amidon de réserve est même épargné dans ces conditions ; c'est le sucre qui est assimilé de préférence ; les sucres sont des constituants normaux de la sève, de sorte que le rôle que nous leur voyons jouer dans le développement des plantules est d'accord avec ce que l'on pouvait logiquement prévoir.

Les alcools éthylique et méthylique ne se rencontrent jamais en quantités sensibles dans la sève ; mais le premier constitue un produit transitoire de l'assimilation du sucre ; il semble donc que nos résultats viennent apporter une preuve de plus en faveur de ce fait. Nous devons ajouter que ces résultats tiennent surtout au dispositif que nous employons pour l'étude de la germination ; les plantules sont constamment placées dans une atmosphère saturée ; l'évaporation est donc peu sensible et par suite aussi la transpiration chez les plantules ; mais si on transporte celles-ci dans des flacons remplis de solutions minérales complètes, de façon à exposer leurs organes aériens à l'atmosphère ambiante, on constate que les plantules cultivées à l'obscurité en présence d'alcool éthylique et d'alcool méthylique périssent assez rapidement, et d'autant plus vite que la température est plus élevée ; on voit ainsi intervenir le rôle de la transpiration dans les résultats observés. Le développement normal des plantules en présence d'alcool éthylique ou d'alcool méthylique ne permet pas de conclure à l'assimilation de ces substances. Lorsque les plantules sont exposées à une atmosphère saturée de vapeur d'eau, elles règlent plus facilement leur absorption et peuvent, sans manifester le moindre trouble, évaporer complètement le liquide de germination.

Les mêmes résultats s'observent en présence de paraldéhyde, mais de là encore on ne peut pas déduire que ce corps soit complètement assimilé ; tout ce que l'on peut dire, c'est qu'une fraction plus ou moins importante est rejetée par la transpiration.

En résumé, dans les conditions où nous nous sommes placés les substances examinées ne gênent pas le développement des graines de maïs ; mais elles retardent de quelques jours l'évolution de l'embyron.

III

INFLUENCE DES SUBSTANCES PRÉCÉDENTES SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MAIS A L'OBSCURITÉ.

L'un de nous a déjà montré[1] que la vesce de Narbonne, cultivée dans des solutions nutritives additionnées de dextrose à l'abri de la lumière, assimile le sucre et même les nitrates ; le poids de substances sèches obtenues de cette façon est bien snpérieur à celui de la graine ; mais l'excédent n'est pas aussi élevé qu'on aurait pu le supposer à priori ; en offrant à une plante à chlorophylle le sucre qu'elle peut se procurer aux dépens du gaz carbonique de l'air, on était fondé à admettre que le végétal pourrait se passer de la fonction chlorophyllienne ; les champignons, qui se développent sur une solution minérale ne renfermant que du sucre comme unique substance carbonée, poussent avec une vigueur remarquable ; il sont placés, il est vrai, dans des conditions de vie normale ; cette distinction ne saurait pourtant nous satisfaire, car il faut remarquer aussi que les végétaux supérieurs ne se développent pas bien dans les milieux liquides ; le maïs ne semble pas en souffrir ; c'est donc à lui qu'il faut s'adresser de préférence pour le genre de recherches qui nous préoccupent ; on a donc refait les mêmes essais avec lui. Voici les résultats qu'on a obtenus.

	Témoins.		Saccharose.			Lactose.	Glycérine.	Amidon.
Durée de l'expérience en jours.	49	49	49	78	90	49	49	49
Poids total de la plante en grammes........	0,2527	0,3711	0,8324	0,8665	1,3385	0,6105	0,5385	0,4535
Poids de l'extrait en grammes...	0,0024	0,0921	0,3090	0,2180	0,2445	0,2020	0,0262	0,0314
Poids réel de la plante en grammes............	0,2503	0,369	0,5234	0,6485	1,0938	0,4085	0,5118	0,4221
Concentration 0/0	»	»	4	4	4	4	2	2

Le poids maximum des graines employées était inférieur à 0 gr. 5.

Les chiffres inscrits à la 4e ligne donnent le poids sec des plantes, déduction faite de l'extrait de la solution nutritive calculé

1. MAZÉ. *C. R.*, t. CXXVIII. 1899, page 185.

sur un volume de liquide correspondant à la différence du poids des plantules a l'état sec et à l'état frais ; cette correction, qui n'est qu'approximative puisque le sucre se dépose à l'état d'amidon dans la tige et dans les feuilles, laisse encore un excédent sensible sur le poids de la graine. La conclusion tirée des expériences faites avec la vesce de Narbonne subsiste donc tout entière, et comme le maïs cultivé à la lumière se développe dans la solution employée aussi bien que dans les meilleurs sols, il faut en déduire que les végétaux à chlorophylle ne peuvent pas se passer des radiations lumineuses. Au moment où l'on a mis fin aux expériencces, les feuilles commençaient à se dessécher et il était visible qu'elles auraient bientôt péri. Ce résultat est d'accord avec ce que l'on sait aujourd'hui des influences multiples des radiations lumineuses sur le développement des végétaux à chlorophylle ; la lumière n'est pas seulement indispensable à la synthèse des sucres ; elle active aussi l'assimilation azotée et d'une manière générale la nutrition minérale ; elle a une influence prépondérante sur la structure anatomique, elle donne naissance enfin à un dégagement abondant d'oxygène naissant dans toutes les parties vertes de la plante ; toutes ces influences essentielles manquent à l'obscurité, de sorte que, malgré tout, les plantes restent étiolées et manquent de vigueur.

Si au lieu de sucre, on leur offre de la mannite, de l'alcool éthylique, de l'alcool méthylique, les poids obtenus à la fin de l'expérience que l'on pousse jusqu'à la mort des plantules, ne dépassent en aucun cas le poids sec des graines ; cela ne vent pas dire qu'aucune de ces substances ne soit assimilée ; mais de ce qu'elles présentent un poids sensiblement plus élevé que celu des plantes témoins cultivées dans des solutions minérales, on ne peut pas déduire d'une façon indiscutable qu'il y ait eu assimilation, car ces substances peuvent s'accumuler en nature dans les tissus, ou bien entraver les phénomènes d'autophagie qui se continuent pendant très longtemps dans les plantules témoins. Si l'on veut démontrer que ces divers corps sont assimilés à l'obscurité, il est nécessaire de modifier le dispositif des expériences.

IV

INFLUENCE DES SUCRES SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MAIS CULTIVÉ A LA LUMIÈRE

Il y a deux façons d'envisager la question; on peut se proposer de faire pousser la plante dans une atmosphère débarrassée de gaz carbonique de façon à atténuer autant que possible le rôle de la fonction chlorophyllienne; nous n'avons pas adopté ce procédé parce qu'il exige l'usage d'appareils clos qui restent constamment saturés de vapeur d'eau, condition qui gêne considérablement la transpiration des feuilles; rien ne prouve d'ailleurs que le gaz carbonique produit par la respiration soit soustrait intégralement à la synthèse chlorophyllienne même en présence de solutions alcalines placée dans la cloche de culture. Nous avons donné la préférence à la deuxième méthode, qui consiste à exposer les organes aériens à l'air libre de façon à imiter autant que possible les conditions réalisées dans la grande culture; le but visé, nous le répétons, revient d'abord à constater une assimilation active et abondante des substances hydrocarbonées, ensuite à obtenir un poids de substances sèches plus élevé que celui que peuvent produire des plantes de même âge cultivées dans une terre très riche.

Pour les cultures en solutions nutritives nous avons fait usage d'un abri vitré largement ouvert sur toutes les faces; les témoins de plein air étaient placés à une vingtaine de mètres de cet abri et se trouvaient par conséquent exposés à des conditions climatériques identiques.

La solution minérale que nous avons utilisée avait la composition suivante :

Eau distillée	1000
Azotate de sodium	1
Phosphate de potassium	1
Sulfate d'ammoniaque	0,25
Sulfate de magnésie	0,20
Sulfate de fer	0,1
Chlorure de manganèse	0,1
Chlorure de zinc	traces
Silicate de potasse	traces
Carbonate de calcium	2

L'expérience que nous en avions permettait de supposer

qu'elle satisferait à toutes les exigences que nous avons formulées; et on verra plus loin que nos prévisions se sont réalisées.

La solution nutritive était préparée par centaines de litres avec des produits chimiquement purs et répartie ensuite dans des flacons de 3 litres que les photographies que l'on trouvera dans ce mémoire nous dispensent de décrire.

On avait donc ainsi des milieux absolument identiques. Tous les flacons que nous avons utilisés dans les diverses séries de culture que nous allons décrire ont été préparés avec la même solution, stérilisés en une seule fois dans le même autoclave. Les substances ternaires ont été stérilisées à part, soit dans l'autoclave, soit par filtration sur bougies Chamberland.

On les a introduites ensuite dans les solutions minérales en quantités rigoureusement dosées. Ajoutons enfin que les graines qui ont servi provenaient toutes du même épi, de sorte qu'en définitive, tous les résultats sont comparables entre eux, non seulement pour une substance alimentaire donnée, mais pour toutes celles que nous avons employées.

Voici les résultats que nous avons obtenus avec les sucres :

SACCHAROSE

Saccharose introduit dans les solutions par flacon : 32 gr. 088

Nos d'ordre	Durée des cultures	Saccharose disparu	Poids sec des plantes	Sucre restant	
				Saccharose	Sucre interverti
—	—	—	—	—	—
	jours	grammes	grammes	grammes	grammes
1	18	4,800	5,400	14,980	12,959
2	30	9,694	13,200	1,453	22,042
3	30	13,847	14,100	5,654	13,039
4	30	14,046	19,430	9,156	9,563
5	30	10,446	21,950	1,359	21,328

DEXTROSE

Dextrose introduit dans les solutions par flacon : 35 gr. 782

6	24	5,277	4,6 (1)
7	24	6,417	6,6 (1)
8	29	11,267	15,533

Ces chiffres permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° Les plants de maïs végétant dans des solutions minérales additionnées de saccharose et de dextrose absorbent et assimilent très activement ces substances;

2° Il n'y a aucune corrélation entre le poids du sucre emprunté à la solution nutritive et le poids sec du végétal; cela

1. Ces deux plantes étaient atteintes de chlorose de sorte que la fonction chlorophyllienne a pris une part très restreinte à leur alimentation.

tient à la part plus ou moins grande prise par la fonction chlorophyllienne à l'élaboration des aliments carbonés; il se trouve justement que c'est la plante qui a fourni le poids le plus élevé de substances sèches qui a absorbé le moins de sucre; ce résultat s'explique si on fait observer que les organes foliaires ne sont pas également bien développés chez toutes les plantes;

3° Le dextrose s'est montré légèrement inférieur au saccharose si l'on fait exception des plantes 6 et 7 qui ont souffert de la chlorose; cette différence peut être attribuée à la pression osmotique de la solution de dextrose bien plus élevée surtout au début que dans la solution de saccharose; mais il est toujours prudent de ne pas émettre d'opinion bien arrêtée sur des questions de cette nature; peut-être l'avantage du saccharose réside-t-il dans ce fait qu'il met à la disposition du végétal un mélange de 3 sucres que l'on trouve toujours dans la sève des végétaux; malgré la tendance que nous aurions à considérer cette différence comme accidentelle, nous devons cependant rappeler que MM. Brown et Morris ont obtenu des résultats analogues en cultivant des embryons d'orge sur des solutions d'hydrates de carbone ;

4° La présence de grandes quantités de sucre interverti dans les solutions qui ont reçu du saccharose permet de conclure à la diffusion de la sucrase dans le liquide qui baigne les racines; cette diastase intervertit peu à peu le saccharose dans un milieu neutre;

5° La quantité de sucrase diffusée est très variable d'une plante à l'autre et n'est pas en relation avec le développement des racines; cette variation traduit des influences individuelles;

6° Les poids des plantes consignés au tableau précédent sont bien plus élevés que ceux des témoins à la même époque; on n'a pas arrêté ces derniers parce qu'on les a réservés pour d'autres essais; mais l'observation suivie de tous ces végétaux nous a permis de faire quelques remarques intéressantes que nous allons maintenant résumer brièvement.

Quelques jours après la mise en flacon, les plantes qui ont reçu du saccharose prennent le pas sur toutes les autres séries : dextrose, glycérine, alcool éthylique, alcool méthylique, témoins. Celles qui végètent dans les solutions de dextrose les

suivent cependant d'assez près et devancent aussi les témoins.



Fig. 1. — Saccharose [1].

Les figures 1 à 4, permettent de constater ces faits. Dans les figures 1 et 2, nous avons reproduit 4 plantes cul-



Fig. 2. — Saccharose.

1. Toutes les photographies que nous reproduisons dans le texte ont été prises le même jour, le 16e après la mise en flacon.

tivées sur saccharose à côté du plus beau des témoins qui nous a servi partout de terme de comparaison.

Malgré la vigueur qu'elles possèdent, les plantes qui assimilent du sucre ne présentent pas une allure normale. Les



Fig. 3. — Dextrose.

feuilles sont rigides, étroites, lancéolées, très longues; chez quelques-unes, le parenchyme est déchiqueté sur les bords,



Fig. 4. — Dextrose.

parcheminé, de sorte que le limbe est réduit à sa portion centrale; chez d'autres, la chlorophylle est absente presque complètement et, malgré cela, la tige est très forte et les racines normales, mieux développées que celles du témoin. Cet ensemble de caractères montre bien que c'est le sucre des solutions nutritives qui fait les frais de la nutrition carbonée, à l'exclusion de la fonction chlorophyllienne; mais, à partir de ce moment, l'aspect change, des feuilles normales apparaissent et l'avance sur le témoin devient de plus en plus considérable.

A mesure que le liquide s'évapore, on le remplace; les tubulures latérales permettent de faire cette opération avec la plus grande facilité sans risque de contamination; les solutions qu'on introduit de cette façon renferment 0,5 0/00 de phosphate de potassium et 0,5 0/00 de nitrate de sodium, car la quantité d'azote introduite au début suffit à peine à l'élaboration de 14 à 15 grammes de substances sèches.

V

INFLUENCE DE LA GLYCÉRINE

La glycérine gêne le développement du maïs à la lumière; comme nous avions déjà observé ce fait, nous avons diminué la dose de glycérine; elle a été fournie à la dose de 0,61 0/00; malgré cela, 2 plantes sur 3 ont péri, après avoir végété péniblement pendant plus d'un mois; les premières feuilles qui apparaissent semblent pourtant normales; mais elles ne tardent pas à sécher; la dessiccation débute par l'extrémité, puis s'étend peu à peu jusqu'à la base; on dirait qu'elles ont subi l'action d'une température trop élevée; la photographie (fig. 5) reproduit les deux plantes les mieux développées à côté du témoin qui présente une avance sensible sur elles; on voit qu'elles manifestent déjà les symptômes que nous venons de décrire. La plante qui a résisté a végété pendant 2 mois; mais elle est restée chétive, ce qui n'a pas empêché l'épi mâle de s'épanouir; son poids sec n'atteignait pas 7 grammes.

Ce résultat prouve par conséquent que, si la glycérine est assimilée en petite quantité, elle n'en est pas moins nuisible à la vie de la plante; les substances alimentaires ne peuvent pas s'accumuler indifféremment dans les organes de la plante sans

troubler la nutrition générale; lorsque les végétaux sont placés à l'obscurité et dans une atmosphère saturée, ils supportent mieux



Fig. 5. — Glycérine.

la présence de ces sortes de substances; mais, lorsqu'on les expose à la lumière et au grand air, l'activité de la transpiration appelle dans les feuilles plus de glycérine que la plante ne peut assimiler, si bien que l'excédent ne tarde pas à devenir nuisible.

VI

INFLUENCE DE L'ALCOOL ÉTHYLIQUE

L'alcool éthylique employé à la concentration de 5 0/00 environ arrête le développement du maïs à la lumière; son action est beaucoup moins sensible sur la germination. Après la mise en flacon, la végétation fait des progrès visibles pendant quelques jours; mais, lorsque les racines ont acquis un peu de développement, elles se transforment peu à peu et, au lieu de continuer à s'allonger, elles s'épaississent en donnant de courtes ramifications. Les feuilles se dessèchent, et la plante meurt.

La photographie (fig. 6) permet de se rendre compte du mauvais état de ces plantes au bout de 15 jours d'exposition à la lumière.

Si on distille ces plantes après les avoir lavées à l'eau, on trouve toujours de l'alcool dans le liquide qui passe à la distillaiotn; il colore en outre la fuchsine décolorée à l'acide sulfureux;

si on fait les mêmes déterminations sur des pieds de même développement qui ont poussé en pleine terre, on ne trouve que des traces d'alcool et pas d'aldéhyde; c'est à l'aldéhyde qui se forme



Fig. 6. — Alcool éthylique.

en excès en présence d'alcool libre qu'il faut attribuer les résultats observés. Cette notion a déjà été développée dans un travail publié par l'un de nous, il y a quelques années [1].

VII

INFLUENCE DE L'ALCOOL MÉTHYLIQUE

Bien différents des précédents sont les résultats fournis par les plantes cultivées en présence d'alcool méthylique à la dose 1,5 0/00. Non seulement ce corps n'est pas nuisible, mais il active le développement du maïs ; comme rien ne nous permettait de prévoir ce fait, nous n'avons cultivé que deux plantules en présence d'alcool méthylique ; toutes deux présentent une avance visible sur le plus beau des témoins vers le quinzième jour de l'expérience, comme on peut le voir sur la photographie (fig. 7.)

Les flacons qui les ont reçues n'étaient pas munis de tubulures latérales, de sorte qu'on ne leur a pas donné de nouvelle solution nutritive; on les a laissées se développer jusqu'à l'évaporation à peu près totale de la solution, et, quand on a mis fin à

1. Mazé. *Annales de l'I. P.* 1900, p. 350, mars 1902, p. 195.

l'expérience, tout l'azote avait disparu du liquide; il restait encore 1gr,08 d'alcool méthylique. Après 37 jours de culture, les deux plantes pesaient, à l'état sec :

N° 1.......	16gr 07
N 2...	15gr 3

Malgré les conditions difficiles qu'on leur a imposées, elles



Fig. 7. — Alcool méthylique.

ont poussé vigoureusement jusqu'à la fin; les témoins ne les ont pas sensiblement devancées.

Ces résultats permettent de conclure que l'alcool méthylique ne nuit pas à la végétation du maïs; comme on ne peut pas admettre que l'alcool qui a disparu de la solution ait été rejeté directement dans l'atmosphère après avoir été filtré par la plante, on est conduit à supposer que ce corps est assimilé en partie.

VIII

DÉVELOPPEMENT DES PLANTES TÉMOINS

Il nous reste maintenant à montrer que la solution minérale que nous avons employée favorise le développement rapide et complet du maïs; il suffit pour cela de suivre jusqu'au bout l'évolution des plantes témoins. Nous aurions pu également suivre beaucoup plus longtemps celles des séries précédentes; mais il n'est pas facile d'alimenter régulièrement un nombre aussi considérable de végétaux placés dans des flacons de 3 litres.

Au surplus, les causes de contamination augmentent à mesure que les plantes s'allongent, parce qu'elles offrent plus de prise au vent; l'agitation continue des tiges fait glisser peu à peu les grains de poussière entre le coton et le corps de la plante; et comme tous les germes qui parviennent jusqu'à la solution peuvent se développer dans celles qui sont pourvues de sucres, nous



Fig. 8. — Plantes de pleine terre et témoin en solution minérale.

avons arrêté les séries les plus exposées à la contamination. Sur les 15 témoins que nous avons réservés, 2 ont été envahis par les champignons assez tardivement et ont été éliminés; un certain nombre d'autres ont été réservés pour des essais dont nous parlerons plus loin; on en a conservé 9, auxquels on a fourni régulièrement, à mesure que la transpiration des feuilles vidait en partie les récipients, des solutions stérilisées renfermant 0,5 0/00 de nitrate de soude et 0,5 0/00 de phosphate de potasse. Les autres éléments minéraux qui entrent dans la com-

position de la solution nutritive ont été introduits dès le début, en quantité suffisante pour face faire aux besoins de la végétation jusqu'au moment où on a mis fin à l'expérience.



Fig. 9 — Témoin en solution minérale fleuri et plantes de pleine terre de même âge.

Nous avons reproduit dans la planche VIII les 5 pieds les plus avancés; cette photographie a été prise le 25 août, c'est-à-dire un peu moins de 2 mois après la mise en flacons.

On voit qu'ils ont acquis leur maximum de taille, environ 1m,70 à 1m,80, flacon compris; ils sont en outre munis de leurs organes de fructifications qui sont tout à fait normaux; dans les plus avancés, la fécondation est terminée, et l'épi est déjà formé;

la pollinisation a été très abondante. La photographie (fig. 9) montre que la taille de nos maïs égale celle des plantes de la même espèce, poussant dans un sol très riche; celles-ci possèdent déjà des épis bien avancés, mais elles sont plus anciennes de 1 mois et demi.

La photographie (fig. 9) reproduit les plantes de même âge qui ont servi de témoins de plein air; malgré les soins de binage, d'arrosage et de butage qu'on leur a prodigués, elles sont en retard de plusieurs jours sur celles qui ont poussé dans les flacons. Pour faciliter la comparaison, nous avons placé à côté des premières la même plante que nous avons déjà reproduite dans la figure, 8.

Cette différence n'est pas due exclusivement à la valeur alimentaire de la solution nutritive ; elle se présente aussi comme la conséquence de la température plus élevée à laquelle les plantes en flacons ont été exposées ; la solution nutritive est chauffée directement par les rayons solaires ; sa température est donc relativement élevée, surtout le jour, et influe sur celle de la tige et des feuilles ; les plantes de pleine terre reçoivent au contraire une solution très sensiblement moins chaude, qui abaisse la température des organes aériens et retarde les progrès de la végétation.

Il n'en est pas moins vrai que le but que nous nous étions proposé est largement atteint.

IX

AUTRES RECHERCHES SUR L'ASSIMILATION DE L'ALCOOL ÉTHYLIQUE ET DE L'ALCOOL MÉTHYLIQUE

Les résultats que nous avons exposés page 734 étaient prévus ; ceux qui ont été fournis par l'alcool méthylique l'étaient moins ; cette discordance dans l'action de deux substances chimiquement aussi voisines semble difficile à interpréter ; on ne peut pas la rapporter à des propriétés antiseptiques inégales, puisque ces caractères ne se sont pas manifestés pendant la période de germination à l'obscurité et qu'ils ne se traduisent pas davantage lorsqu'on transporte les plantules dans des flacons, toujours à l'obscurité, puisqu'elles meurent rapidement en présence de l'un et l'autre corps. La raison de cette différence est ailleurs ;

si on admet que l'alcool éthylique et l'alcool méthylique ne peuvent pas circuler en nature dans la sève d'une plante à chlorophylle sans être modifiés dans leur composition et si l'on rappelle que ces modifications ne peuvent consister qu'en une oxydation qui débute par la formation d'aldéhydes, on est conduit à examiner les relations que présente la production possible d'aldéhyde méthylique avec la synthèse des sucres.

L'aldéhyde éthylique ne peut pas aboutir aux sucres par voie de polymérisation; l'aldéhyde méthylique en forme au contraire avec la plus grande facilité dans les végétaux à chlorophylle, on le suppose du moins; et nous arrivons, comme on le voit, par un chemin détourné, à l'hypothèse la plus généralement admise pour interpréter le mécanisme de la synthèse chlorophyllienne.

Considérée sous ce point de vue, la question de l'assimilation de l'alcool méthylique mérite d'être approfondie; on peut se proposer d'abord de montrer que l'alcool méthylique peut contribuer à former des réserves d'amidon dans les chloroleucites à l'obscurité, bien que cette propriété ne lui ait pas été reconnue jusqu'à présent.

Les végétaux à chlorophylle ne se prêtent pas indifféremment à des recherches de cet ordre; il y a des espèces plus résistantes à des doses élevées d'alcool; il y en a qui sont plus ou moins capables d'oxyder l'alcool méthylique.

Parmi celles qui résistent à de très fortes doses d'alcool, il faut citer le lilas, le troène, la clématite des haies. Nous avons placé des branches de lilas dans des solutions d'alcool méthylique et éthylique à 10 0/0; elles ont résisté plusieurs jours en plein soleil à une température souvent supérieure à 30°, exactement comme des branches témoins placées dans l'eau distillée; des branches qui pesaient 8 à 10 grammes à l'état sec ont évaporé 500 c. c. d'une solution alcoolique renfermant 50 c. c. d'alcool méthylique à 99 0/0 ou 50 c. c. d'alcool éthylique, avant de périr.

La presque totalité de l'alcool a été rejetée dans l'atmosphère, mais une certaine quantité a été transformée; les plantes ainsi traitées exhalent en effet un parfum très prononcé, que l'on perçoit même à distance; le lilas en particulier dégage une odeur très agréable, le parfum produit par l'alcool éthylique est

dû en partie à l'acétate d'éthyle; l'alcool est donc oxydé et éthérifié ; on peut s'assurer directement par la distillation de la présence d'aldéhyde éthylique ou méthylique.

Le troène, la clématite supportent également des doses de 5 0/0 d'alcool dans les mêmes conditions. Nous nous sommes servis de ces trois espèces végétales pour étudier la formation de l'amidon dans les feuilles à l'obscurité en présence d'alcool méthylique ou éthylique à 4 0/0. L'alcool éthylique ne saurait, nous le répétons, produire directement de l'amidon ; mais il peut retarder la disparition de ce corps, s'il est assimilé en quantité sensible.

Nous résumons brièvement les résultats obtenus, qui d'ailleurs sont tous négatifs, en ce qui concerne la formation d'amidon :

Les rameaux feuillés qui ont perdu leur amidon de réserve par un séjour préalable à l'obscurité ne le récupèrent pas aux dépens de l'alcool méthylique.

Les branches placées dans les solutions alcoolisées au moment où les leucites sont remplis d'amidon, perdent leurs réserves comme celles qui sont placées dans l'eau distillée.

Les mêmes observations ont été faites sur des pieds de maïs bien développés, placés dans des solutions minérales dans lesquelles on introduisait 2 0/0 d'alcool éthylique ou méthylique.

Nous devons ajouter que les branches qui avaient subi ce traitement ne reformaient pas d'amidon à la lumière, exception faite cependant des cellules stomatiques ; les résultats obtenus à l'obscurité, ne prouvent donc pas que ces alcools ne sont pas assimilés.

Dans tous ces essais, l'alcool méthylique s'est comporté comme l'alcool éthylique, ce qui donne encore plus d'intérêt aux observations de la page 735.

X

OBSERVATIONS SUR LA CHLOROSE DU MAÏS

Lorsqu'on place les plantules de maïs dans des solutions minérales additionnées de sucres, on constate assez souvent la décoloration quelquefois complète des feuilles ; cette chlorose se manifeste parfois chez les premières feuilles qui se forment après la mise en flacons ; tout dépend de la concentration

en sucres, et dans une certaine mesure de la résistance inégale des plantules. Sur les trois plantes alimentées avec du dextrose dont nous avons donné l'histoire page 729, deux sont devenues chlorotiques.

Le plus souvent, les maïs surmontent assez vite cette crise; la chlorophylle se forme peu à peu, d'abord le long des nervures et de là elle se propage dans tout le parenchyme; la plante reprend alors sa vigueur.

Lorsque la chlorose dure longtemps, elle retarde sensiblement le développement du végétal, de sorte que ce sont les plantes témoins qui prennent les devants. Nous en donnons un exemple dans la figure 10. La plante du milieu végète dans une solution additionnée de 1,2 0/0 de dextrose; elle est atteinte de chlorose et présente un retard très sensible sur les deux témoins du même âge qui l'encadrent La chlorose provoque en outre quelques symptômes de souffrance tels que la formation de tiges secondaires à l'aisselle des feuilles (fig. 11); le retard sur le témoin est très marqué aussi dans ces conditions [1].



Fig. 10. — Plante développée en solution sucrée à 1,2 0/0 de dextrose au milieu plante chlorotique; à droite et à gauche, plantes témoin de même âge.

1. Ces plantes, de même que celles de la figure 10, n'appartiennent pas à la même série que celles dont nous avons parlé précédemment.

On voit ainsi combien il est utile de multiplier les expériences avant de formuler des conclusions solides. Les exemples que nous venons de citer, nous auraient plutôt conduits à envisager



Fig. 11. — A gauche, plante chlorotique, en solution sucrée, pourvue de nombreuses ramifications; à droite, plante témoin en solution minérale.

l'action du dextrose comme nuisible ; c'est le contraire qui est exact; ce composé est favorable au développement du maïs quoique à un degré moindre que le saccharose; les accidents de végétation qu'il provoque constituent une exception.

Ces résultats montrent que la disparition de la chlorophylle dans les plantes vertes peut être provoquée par des causes multiples, en particulier par des substances tout à fait indispensables à la vie des plantes et cela, en présence d'un excès de fer.

On attribue toujours la chlorose à la pénurie de fer dans la plante. Rien n'est en effet plus facile que de rendre les végétaux chlorotiques par défaut de fer. Nous avons, après beaucoup de physiologistes vérifié ce résultat sur des plantules de maïs poussant à l'abri des microbes.

En supprimant le fer dans la solution dont nous avons donné la composition page 728 voici ce que nous avons observé : les premières feuilles qui se forment après la mise en flacon sont complètement décolorées, et à partir de ce moment toutes celles qui apparaissent sont dépourvues entièrement de chlorophylle tout en étant exposées directement au soleil ; les plantules n'augmentent pas de poids, les feuilles restent très petites, et à mesure que de nouvelles se forment, les plus âgées se flétrissent ; la marche de la végétation est identique chez les plantules placées dans l'eau distillée, avec cette différence essentielle que les feuilles conservent indéfiniment leur couleur verte ; dans les deux milieux, le développement des racines atteint des proportions démesurées par rapport à la plantule ; celles-ci forment un lacis de fin et long chevelu, dont les filaments principaux pourvus de très nombreuses ramifications atteignent de 40 à 50 centimètres de longueur.

Quelques plantes ont végété ainsi pendant deux mois ; elles étaient encore très vivaces ; placées dans une solution minérale complète, elles ont formé des feuilles normales, et ont repris de la vigueur ; la hampe qui s'édifie sur la tige courte et grêle développée jusque là, augmente brusquement de diamètre. Au bout de quelques jours, on voit apparaître un épi simple, émergeant d'un bouquet de trois ou quatre feuilles de grandeur moyenne, qui présente cette particularité curieuse d'être constitué par des fleurs mâles vers l'extrémité, et des fleurs femelles à la base.

Pour obtenir ainsi la chlorose par privation de fer, il n'est pas nécessaire de faire usage d'une solution minérale de constitution aussi complexe que celle que nous avons employée ; nous avons reproduit le même phénomène en utilisant des solutions renfermant 1 0/00 de phosphate de potassium et 1 0/00 de nitrate de sodium ; mais pour le rapporter à sa véritable cause il était indispensable d'employer la première solution.

Pour interpréter ces résultats, il est nécessaire de multiplier les observations, étant donné que la chlorose peut avoir, comme on l'a vu plus haut, des causes très variées ; on peut déjà se proposer pourtant de fournir une explication des derniers faits que nous venons d'exposer. Puisque les plantes cultivées dans l'eau distillée conservent leur couleur verte, il faut bien admettre que le fer y circule librement, et comme c'est le contraire

qui s'observe chez les plantes cultivées dans des solutions privées de fer, c'est bien aussi la conclusion opposée qu'il faut en déduire. Les bases alcalines et alcalino-terreuses semblent donc immobiliser le fer apporté par la semence si on les introduit en grande quantité dans la solution; ces mêmes bases existent également dans les plantules qui poussent dans l'eau distillée, et, comme il ne s'y produit rien d'anormal, il est permis d'en déduire qu'elles ne suppriment pas l'action du fer. Il existe donc entre ces bases et le fer un rapport numérique tel que le rôle de ce dernier peut être favorisé ou au contraire supprimé.

En partant de cette idée, nous avons rendu chlorotiques des maïs vigoureux et bien développés, en introduisant dans les solutions minérales complètes des doses de plus en plus fortes de carbonate de potassium ou de sodium. Les jeunes plantules ne résistent pas à une alcalinité de 1/10,000 évaluée en NaOH ; c'est pour cela qu'il faut faire usage de plantes bien développées; mais, comme celles-ci réagissent, il est nécessaire d'augmenter progressivement l'alcalinité du milieu de façon à obtenir la décoloration partielle des feuilles, sans faire périr la plante : Les feuilles déjà développées conservent leur couleur normale; la chlorose ne se manifeste que sur les feuilles formées après l'addition de carbonates alcalins ; quand elle apparaît on constate un ralentissement sensible de la végétation.

La chlorose ainsi provoquée présente beaucoup d'analogie avec la chlorose naturelle qui sévit principalement sur les vignes greffées, plantées dans des sols trop riches en calcaire. Dans ces vignes, la chlorose se présente aussi comme la conséquence d'un excès de chaux dans la plante, et non d'une absence totale de fer. Il arrive même fréquemment qu'une vigne devient malade brusquement à la suite de pluies persistantes, alors que d'ordinaire elle n'est pas sujette à la chlorose ; ce n'est pas le fer qui manque dans ces conditions, c'est la chaux qui est absorbée en trop grande quantité à la suite des pluies ; il y a donc excédent de chaux par rapport au fer. Le traitement imaginé par Rességuier, et qui fournit de très bons résultats, n'est pas efficace seulement par la réserve de fer qu'il introduit dans la plante, mais aussi par l'acide sulfurique qui neutralise une partie de la chaux.

Voilà ce que l'on peut déduire des observations que nous

avons faites jusqu'ici; mais nous ne donnons pas cette interprétation comme définitive, car, nous le rappelons encore une fois, des conclusions fermes doivent reposer sur des expériences nombreuses et variées.

XI

RÉSUMÉ DES CONCLUSIONS

Les sucres, la glycérine, l'alcool méthylique, l'alcool éthylique retardent de quelques jours la germination des graines de maïs, mais ne gênent nullement l'évolution des plantules.

Les sucres sont assimilés à l'obscurité, mais ils ne peuvent suppléer l'action de la lumière dont le rôle ne se borne pas à faire la synthèse du sucre.

Ces substances introduites dans la solution minérale sont assimilées très activement à la lumière, concurremment avec celles qui résultent de la fonction chlorophyllienne; les plantes se développent plus vite que les témoins placés dans des solutions minérales, lesquels devancent, de leur côté, les plantes qui poussent en pleine terre dans un sol très fertile.

On peut prévoir, en s'appuyant sur ces résultats, que les substances organiques solubles du sol peuvent contribuer à l'alimentation des végétaux supérieurs; le fumier est utile non seulement par les sels minéraux qu'il peut fournir, mais aussi par les matières organiques solubles qu'il renferme.

La glycérine est absorbée également à la lumière, mais elle gêne le développement des plantes.

L'alcool éthylique est très nuisible à la lumière du moins pour le maïs; sa nocivité tient à la production d'aldéhyde.

L'alcool méthylique active la végétation du maïs à la lumière, ce qui permet de supposer qu'il est assimilé.

La tolérance des végétaux à chlorophylle pour les alcools méthylique et éthylique est variable; il y a des espèces qui résistent à des doses très élevées, mais ces composés ne peuvent pas contribuer à la formation d'amidon à l'obscurité, ni protéger l'amidon emmagasiné dans les leucites; ce dernier disparaît en leur présence à l'abri de la lumière, aussi vite que dans la tige feuillée, ou dans les végétaux entiers placés dans l'eau distillée, ou dans une solution minérale complète.

L'addition de dextrose aux solutions minérales peut provoquer la chlorose chez le maïs exposé à la lumière ; c'est une cause de plus à ajouter à bien d'autres d'une maladie qui se manifeste fréquemment chez les végétaux. En examinant la chlorose produite par la pénurie de fer, nous avons été conduits à l'attribuer non à l'absence complète de fer, mais à une exagération de la teneur du végétal en bases alcalines ou alcalino-terreuses qui immobilise le fer, ou tout au moins supprime son action.

LÉGENDE DES PLANCHES VII ET VIII

Les photographies reproduites dans le texte et dans les planches ont été prises par M. le Dr Loiseau ou par M. Roussel, qui ont bien voulu consacrer à ce travail leur temps et leur habileté de photographes expérimentés. Nous leur exprimons toute notre reconnaissance.

Planche VII. — Germination du maïs, dans l'eau distillée (série du bas) ; dans une solution de dextrose à 4 0/0 (série du milieu), dans une solution de glycérine (série du haut).

Planche VIII. — Plantes témoins en solution minérale complète, photographiées le 25 août, c'est-à-dire 59 jours après la mise en flacons.

TÉTANOS ET QUININE

Par M. E. VINCENT

Médecin-Major de 1re classe. Professeur au Val-de-Grace.

(Travail du Laboratoire de Bactériologie du Val-de-Grâce.)

I

L'histoire médicale du tétanos fait mention d'un nombre assez élevé de cas de cette affection survenus à la suite des injections de quinine. Roberts [1], Odevaine [2], en ont relaté plusieurs exemples. Dans les pays tels que la Grèce, où le paludisme règne fréquemment sous la forme grave, Marcoussis, Kapetenakis, etc., ont vu le tétanos succéder au même mode de traitement [3]. Il en est de même à Madagascar où les médecins de la marine ont constaté l'apparition du tétanos dans de semblables conditions [4] Laugier a observé quatre faits, tous mortels, de tétanos chez des paludéens soumis aux injections de quinine [5]. Segard [6] a noté un cas identique, suivi de mort. Burot rapporte avoir vu, en 1895, 4 décès par tétanos ayant la même origine [7]. Pendant l'expédition de Madagascar, Emery-Desbrousses signale qu'en moins d'un mois, il se produisit, à Majunga, un total de 11 cas de tétanos survenus après des injections de quinine [8].

Enfin M. A. Laveran [9] et, plus récemment, Patrick Manson [10] ont spécialement appelé l'attention sur les dangers des injections de quinine et sur le tétanos qu'elles peuvent déterminer.

La caractéristique clinique de ces cas de tétanos postquinique est *leur marche ordinairement suraiguë, parfois foudroyante*. Beaucoup de malades sont morts 24 heures et même moins

1. H. P. Roberts. Tetanus following the hypod. inj. of. quinine in malarious fever. *The Lancet*, 20 mai 1876, p. 736.

2. Odevaine. Cité par Richelot. Nature et traitement du tétanos. *Revue des sciences médicales*, X, 1877, p. 727.

3. *Conf.* Le Dentu et Delbet. *Traité de Chirurgie*. T. I, p. 87.

4. L. Vincent et Burot. Le palud. à Madagascar. *Acad. de Médecine*, 7 avril 1896, p. 385.

5. Cité par Burot, *Acad. de Médecine*, 2 févr. 1897, p. 126.

6. Segard, *Arch. de Médec. nav.*, 1886, t. XLVI.

7. Burot. Le tétanos à Madagascar. *Loc. cit.*.

8 Emery. Desbroussés. Tétanos et inj. hypodermique de quinine. *Bullet. génér. de thérap.*, 1901. t. CXLI, p. 647,

9. A. Laveran. *Traité du paludisme*. Paris, 1898, p. 349.

10. P. Manson. *Malad. des pays chauds*. Traduct. Guibaud et Brengues. Paris, 1904, p. 155.

de 18 heures après le début des symptômes tétaniques (Roberts, Segard, Burot, etc..).

Il n'a pas paru douteux aux médecins dont je viens de rapporter les travaux que le tétanos a bien réellement été la conséquence des injections de quinine. et leur conviction était telle que certains ont cru devoir abandonner ce mode de traitement. Cette opinion était corroborée par ce fait que les tétaniques ne présentaient souvent, au moment de ces accidents, aucune lésion traumatique. Toutefois, quelques-uns des observateurs ont constaté, sur diverses parties du corps de leurs malades, des excoriations ou des plaies ayant pu servir de porte d'entrée au bacille de Nicolaièr.

Comment pouvait-on interpréter ces faits?

* * *

En lisant les observations, déjà nombreuses, de tétanos survenu dans les conditions qui précèdent, on ne peut, évidemment, se défendre de l'idée que cette affection a été, purement et simplement, la conséquence d'une faute de technique chirurgicale. Mais cette explication, acceptable pour les cas antérieurs à la période antiseptique de la chirurgie, paraît plus difficilement applicable aux faits récents, dans lesquels il a été expressément spécifié que le tétanos est apparu bien que les injections eussent été faites « avec toutes les précautions d'antisepsie et d'asepsie [1] ».

Sans doute, cette affirmation peut ne pas apporter avec elle la conviction. Sa valeur se fortifie, cependant, d'une utile remarque : c'est que le tétanos n'a frappé que certains sujets, respectant d'autres malades soumis simultanément au même procédé de traitement.

La raison qui précède semble devoir être opposée aussi à l'hypothèse d'une infection due, non aux instruments ou à l'état septique de la peau, mais à l'impureté de la solution de quinine elle-même. Toutefois ce dernier point reste en suspens parce que nous ne savons pas si le bacille du tétanos conserve sa vitalité en présence des sels de quinine.

Avant de poursuivre cet exposé, je suis donc conduit à mentionner ici brièvement les essais que j'ai faits en vue de vérifier

1. Emery Desbrousses, *loc. cit.*.

l'action des sels de quinine, sur le bacille pathogène du tétanos.

Le pouvoir antimicrobien de la quinine, depuis longtemps démontré, n'est pas cependant très accusé à l'égard du bacille de Nicolaier. Comme tous les microbes sporulés, ce dernier offre, en effet, une grande résistance à l'action des antiseptiques.

Les cultures sporulées, mélangées, à volume égal, à des solutions à 1/20, 1/10, 1/5 de sulfate, de sulfovinate, de bromhydrate, de chlorhydrate *basique* de quinine, ont conservé toute leur vitalité et leur virulence après 15 et 20 jours; les essais n'ont pas été poursuivis au delà.

Seul, le chlorhydrate *neutre* de quinine a, sur les spores tétaniques, un pouvoir bactéricide beaucoup plus énergique.

C'est, du reste, le sel le plus usuellement employé dans les injections. Sa solution à 1/2 mélangée, à volume égal, à une culture sporulée de tétanos, détruit la vitalité du microbe en 40 à 48 heures, parfois moins.

L'addition au bouillon, d'une proportion de chlorhydrate neutre de quinine égale à 3 0/00, empêche la multiplication de ce microbe.

Ce dernier sel possède donc des propriétés germicides réelles à l'égard des spores du bacille de Nicolaier. Ces propriétés s'expliquent, en partie, par la réaction très acide qu'il présente. Quoique chimiquement neutre, il rougit fortement le tournesol et attaque même les métaux. Dès lors, la propagation du tétanos par les solutions non stérilisées de chlorhydrate neutre de quinine doit se trouver fort restreinte par suite de la rapidité avec laquelle il tue les spores.

Mais les autres composés de quinine n'ont pas la même propriété et il est indéniable que leurs solutions, mal stérilisées, pourraient être capables d'apporter avec elles le microbe du tétanos, comme la gélatine est susceptible de le faire dans des conditions semblables. C'est un fait qu'on ne doit pas oublier dans la pratique.

Toutefois, une pareille interprétation ne semble pas devoir tout expliquer. Ainsi qu'on le verra, le problème de l'étiologie du tétanos postquinique est plus complexe. Il est loin de se ramener à la formule simple d'une inoculation accidentelle due à la négligence de l'opérateur. N'est-il pas très remarquable, en effet, que la quinine, bien qu'elle soit infiniment moins

employée en injections hypodermiques que d'autres médicaments tels que la morphine, la caféine, la strychnine, la cocaïne, l'éther, etc., présente seule, la propriété de provoquer l'éclosion du tétanos? J'ai consulté avec soin des documents très nombreux et n'ai vu qu'une fois mentionné un cas de tétanos paraissant avoir succédé à une injection de morphine. N'a-t-on pas, dès lors, le devoir de se demander si une injection de quinine, pratiquée avec toutes les précautions antiseptiques que comporte une opération aussi simple, ne serait pas, cependant, capable d'évoquer l'infection tétanique chez un individu porteur du microbe à l'état latent? En d'autres termes, si, à l'exemple de certaines substances chimiques telles que l'acide lactique, la triméthylamine, le chlorure de sodium en solutions hypertoniques ou même isotoniques [1], certains poisons microbiens, etc., la quinine, introduite sous la peau, *n'aurait pas la propriété d'exercer un rôle favorisant dans le développement de l'infection tétanique.*

Cette question présente un certain intérêt pratique. Les recherches qui suivent vont essayer de lui donner une réponse.

II

Avant de commencer ces expériences, il était nécessaire de déterminer les proportions de quinine que les animaux de laboratoire peuvent supporter impunément, et si ces derniers ne présenteraient pas, à l'égard de cette substance, une sensibilité trop vive, capable d'exclure toute comparaison avec les résultats observés chez l'homme.

La dose mortelle, sous-cutanée, de chlorhydrate neutre de quinine, m'a paru être égale à 1/3,000, en moyenne, du poids du *cobaye*. Pour le *lapin*, cette quantité est de 1/4,500, environ, du poids de l'animal. Les animaux jeunes (cobaye, lapin) sont un peu moins résistants que les adultes. Le pigeon, la grenouille, sont comparativement plus résistants aux injections de cette substance.

La toxicité de la quinine pour l'*homme* ne paraît pas être inférieure à celle qu'elle présente pour le lapin et pour le

1. H. VINCENT. Infl. favoris. du NaCl sur certaines infections. *Soc. de Biologie*, 4 juin 1904.

cobaye. Peut-être, même, l'homme est-il plus sensible que ces animaux. La dose mortelle, sous-cutanée, pour l'homme, n'est pas connue. Mais, par la voie digestive, cette dose peut se déduire d'un exemple suivi de mort, cité par M. Laveran et emprunté à Baills; cette quantité[1] est de 12 grammes de sulfate de quinine absorbés en une fois. Pour un homme d'un poids moyen, elle serait donc égale à 1/5,000 ou 1/6,000 du poids du corps. Or on peut introduire une dose proportionnellement semblable dans l'estomac du cobaye, sans jamais tuer cet animal.

Puisque la sensibilité des animaux pour la quinine ne dépasse pas celle de l'homme et qu'elle paraît même plus faible, nous sommes en mesure d'expérimenter *in anima vili* si la quinine exerce réellement une influence favorisante sur l'infection tétanique.

Pour imiter, aussi exactement que possible, les conditions observées en pathologie humaine, et afin de vérifier si ce médicament joue un rôle favorisant local ou général, la quinine a été injectée : 1° au même point que la culture de tétanos; 2° en un point éloigné.

Ces diverses injections ont été faites tantôt simultanément, tantôt à des dates différentes.

1° *Influence favorisante locale des sels de quinine.* — A une solution titrée et stérilisée d'un sel de quinine, on mélange une petite quantité de culture sporulée de tétanos. Cette culture a été chauffée préalablement à 80° pendant 3 heures pour en détruire la toxine.

On injecte ensuite, sous la peau d'un cobaye témoin, 1/5 de c. c. de culture sporulée chauffée et, à un autre cobaye, la même culture additionnée de la solution quinique : la quantité de sel quinique injectée est de 2 à 5 centigrammes.

Or, tandis que le cobaye témoin demeure indemne, le cobaye ayant reçu le mélange quinine et spores présente, au bout de 3 jours, les symptômes d'un tétanos auquel il succombe en 24-48 heures.

Certains animaux (1 sur 5, en moyenne) ont eu un tétanos *suraigu* avec généralisation d'emblée des contractures, ébauche de tremblement vibratoire. Ils sont morts en 18 à 24 heures.

1. A. Laveran. *Traité du paludisme.* Paris, 1898, page 363.

Lorsqu'on fait l'autopsie des cobayes, on découvre, au foyer d'inoculation, un léger exsudat gris-jaunâtre, renfermant de nombreux bacilles. La lésion locale a été toujours plus marquée avec le chlorhydrate neutre de quinine qu'avec les autres composés de cet alcaloïde.

Le microscope et la culture permettent de constater la multiplication du bacille de Nicolaïer au seul foyer d'inoculation. Mais, fait plus remarquable, chez ceux des cobayes qui ont succombé à la forme suraiguë du tétanos, il n'a pas été rare de rencontrer le bacille par l'ensemencement de parcelles du foie, de la rate, des reins, des ovaires, de la moelle osseuse. A la vérité, cette extension partielle de l'infection dans les viscères n'a pas la constance ni surtout l'intensité qu'elle présente chez les animaux inoculés du tétanos et échauffés artificiellement à l'étuve [1]. En particulier, l'examen microscopique des frottis viscéraux ne montre pas de bacilles, et le sang ensemencé n'a jamais fertilisé les milieux de culture. Toutefois, il était utile de faire remarquer que l'action favorisante des sels de quinine est, expérimentalement, très accusée, puisqu'elle peut, dans quelques cas, faire perdre à l'infection tétanique son caractère habituel d'infection exclusivement locale.

Quel que soit le sel de quinine utilisé, son addition aux spores s'est révélée comme un adjuvant fidèle de l'infection, chez le cobaye. Le rat blanc, la souris blanche, prennent également le tétanos, dans les conditions qui précèdent. Chez le lapin, ce moyen est, cependant, habituellement incapable de provoquer l'éclosion de la maladie. Ce n'est pas là, du reste, un fait exceptionnel dans l'histoire du tétanos expérimental, car cet animal est beaucoup plus rebelle que le cobaye, la souris ou le rat, à l'infection tétanique, et certaines conditions favorisantes, telles que l'injection de Na Cl ou même l'action si énergique de l'hyperthermie demeurent, à cet égard, sans effet sur lui, ainsi que je l'ai montré dans d'autres travaux.

Lorsque, chez le cobaye, on fait pénétrer le mélange quinine et spores, non plus sous la peau, mais dans les viscères, la puissance favorisante de la quinine se montre extrêmement redoutable, et la production du tétanos splanchnique, si elle est identique, par son ensemble de symptômes, à ceux que détermine

1. H. Vincent, *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1904, p. 450.

l'inoculation des spores seules, en diffère, cependant, par une marche encore plus aiguë et une survie plus brève. La mort peut survenir en 14 à 16 heures. Le bacille peut être retrouvé non seulement dans le viscère inoculé, mais encore dans les autres viscères.

Dans les expériences ci-dessus, la solution de quinine et le tétanos ont été injectés simultanément. Qu'adviendra-t-il si, après avoir introduit des spores tétaniques sous la peau du cobaye, on n'injecte qu'un ou plusieurs jours après — toujours *eodem loco* — la solution favorisante ?

Dans ce cas, on voit également se produire le tétanos, à la condition que l'intervalle qui sépare l'inoculation des spores de l'injection de la quinine ne soit pas trop grand. Après 1 à 4 jours, cette injection éveille l'infection ; lorsque le délai atteint une semaine, le tétanos est apparu une fois sur trois. Au-delà, le tétanos est exceptionnel.

L'explication de ces faits réside évidemment dans la propriété que possèdent les spores tétaniques de se conserver assez longtemps en état de vie latente dans l'organisme où elles ont été déposées. L'action de la quinine rompt cet équilibre ; elle permet la germination des spores demeurées vivantes. Je dirai bientôt par quel moyen.

Lorsque, inversement, on injecte d'abord la solution quininée et, quelques jours plus tard, *au même point*, une culture de tétanos sans toxine, on détermine également le tétanos même si la quinine a été injectée 6 et 8 jours auparavant.

Il y a là, en apparence, un fait bien singulier, sinon paradoxal, car, dans ces cas, la quinine a été depuis longtemps éliminée de l'organisme [1]. Il est, cependant, facilement explicable : c'est qu'alors l'influence de la quinine s'est exercée d'une autre manière, par l'intermédiaire de la *lésion locale* qu'elle détermine dans le tissu cellulaire.

En ce point, il se forme une sorte d'ulcère sous-cutané, lent à guérir, recouvert d'un exudat gris-jaunâtre. Ce foyer de nécrose locale constitue un lieu de moindre résistance où les spores tétaniques peuvent facilement germer dès qu'elles y ont été déposées. Le microscope y montre, en effet, une grande rareté des cellules leucocytaires. Les bacilles s'y multiplient

1. Cette élimination totale se fait en 36 ou 48 heures, par les urines (Kerner).

dans les mêmes conditions que dans un foyer contus ou hémorrhagique.

2° *Influence favorisante générale des sels de quinine à l'égard de l'infection tétanique.* — Quelle que soit la nature du sel de quinine associé aux spores tétaniques, il favorise donc localement la la germination de ces dernières. On peut, encore, se demander si, introduite en un point éloigné de la porte d'entrée du tétanos, la quinine posséderait la même propriété.

Cette question n'est pas sans intérêt. Ne se pose-t-elle pas, du reste, toutes les fois que le tétanos succède, chez l'homme, à des injections de quinine apparemment bien faites ? Un sujet, ayant eu une plaie accidentelle qui a permis la pénétration insidieuse du bacille, sera-t-il, plus tard, à l'abri du tétanos, à la suite d'injections hypodermiques de quinine opérées avec les plus rigoureuses précautions ?

L'expérience est facile à réaliser chez l'animal. Ses résultats sont non moins précis.

On prend un cobaye pesant 300 à 400 grammes et on inocule, sous la peau du flanc droit, cinq gouttes de culture sporulée privée de toxine. Deux jours après, on injecte sous la peau *du côté opposé*, c'est-à-dire à gauche, 1/10 de c. c. de solution stérilisée de chlorhydrate neutre de quinine à 1/2.

Or, trois jours après cette injection de quinine, apparaît une raideur du tronc ; le lendemain, le tétanos affecte un caractère aigu et la mort survient en 24-36 heures, en moyenne.

Les deux cobayes témoins ayant reçu, l'un la même quantité de culture, l'autre la même dose de quinine, restent parfaitement indemnes.

Cette expérience, répétée plusieurs fois, a toujours fourni un résultat uniforme. Chez les cobayes jeunes, la mort survient plus rapidement à la suite de la double injection faite, cependant, en des point différents.

Au foyer d'inoculation des spores tétaniques, il n'existe aucune lésion. L'examen microscopique du frottis du tissu cellulaire, maintes fois pratiqué, ne montre, aucun bacille ; *les spores ne se sont donc pas multipliées en ce point.* Seul l'ensemencement de parcelles du tissu cellulaire donne une culture. Mais il est évident que le microbe du tétanos n'y existe qu'à l'état extrêmement rare.

Dès lors, où s'est localisé le foyer d'infection tétanique?

Du côté opposé, au point où la quinine a été injectée, il existe un placard pseudo-membraneux blanchâtre, œdémateux. Or les frottis de cet exudat *renferment des bacilles parfois très nombreux, agglomérés en petits bouquets de quatre, six, dix éléments.* La culture donne le bacille de Nicolaïer à l'état pur.

Insistons un peu sur cette constatation. On sait que chez les animaux ayant succombé à l'infection tétanique, le bacille prolifère exclusivement là où il est inoculé. Il ne se généralise pas. En conséquence, sa rareté extrême, dans le cas présent, au foyer même d'inoculation du bacille et, par contre, sa présence abondante en un point éloigné où la quinine, seule, a été injectée, constituent un fait digne d'être signalé. Elles indiquent que le bacille s'est arrêté et qu'il s'est multiplié presque exclusivement *non pas au point où il a été déposé, mais au foyer même d'injection du sel de quinine*

J'ai déjà signalé ailleurs que les solutions hyper — et même isotoniques de chlorure de sodium possèdent la même et remarquable propriété de favoriser et de *fixer* l'infection tétanique[1]. On voit, dès lors, que dans l'un et l'autre exemple, en présence d'un cas de tétanos survenu, chez l'homme, à la suite d'injections de quinine ou de sérum artificiel, il pourrait être imprudent d'attribuer à l'absence de précautions antiseptiques les bacilles tétaniques constatés au niveau du foyer d'injection de ces solutions.

Chez les animaux détenteurs, à l'état latent, de spores tétaniques, la propriété que possède la quinine de réveiller l'infection disparaît au bout de 6 à 8 jours, en moyenne. Au delà de ce délai, les injections de quinine ont été inefficaces.

Les symptômes observés chez les cobayes sont assez variés. Quelques animaux ont eu un tétanos chronique. Chez un autre, le tétanos est apparu seulement une semaine après l'injection stérilisée, mais il a été très redoutable, et a tué l'animal en 20 heures. Pareils cas, à incubation très prolongée et à évolution pourtant suraiguë, ont été observés également chez l'homme, à la suite des injections de quinine. Contrairement à l'opinion

1. H. Vincent, *loc. cit.* Il est probable que d'autres substances favorisantes possèdent la même influence.

consacrée, l'apparition tardive des symptômes tétaniques n'implique donc pas toujours leur bénignité.

Chez deux de ces cobayes, l'incurvation du tronc a débuté non du côté où les spores ont été inoculées, mais du côté opposé, correspondant au siège de l'injection de quinine. La multiplication habituelle du bacille en ce dernier point explique cette particularité.

Si l'on injecte la quinine en premier lieu et qu'ultérieurement on inocule, du côté opposé, une culture sans toxine, le tétanos peut apparaître, mais avec beaucoup moins de fixité que dans les conditions inverses, étudiées ci-dessus. Au bout de deux ou trois jours, le tétanos ne se réalise plus.

III

Les sels de quinine ne semblent capables de favoriser l'infection tétanique, soit chez l'homme, soit chez les animaux, que lorsqu'ils sont administrés sous la peau. Si l'on en fait absorber *per os*, à des cobayes, une dose élevée, suffisante pour déterminer l'ivresse quinique, et qu'on leur inocule simultanément sous la peau des spores sans toxine, ils ne prennent pas le tétanos. Même résultat négatif avec les injections intrarectale, intravésicale, intranasale, intratrachéale de quinine. On a fait ingérer de force, à plusieurs cobayes, du verre pilé arrosé de culture tétanique et on a injecté en même temps sous leur peau une certaine quantité de quinine ; ces animaux sont restés indemnes [1]. L'essai inverse (quinine par la voie digestive, spores sous la peau) a été également infructueux.

Il résulte des recherches qui précèdent que les sels de quinine, injectés sous la peau, exercent une double action favorisante, locale et générale, sur l'infection tétanique. Par la nécrose partielle du tissu cellulaire qu'ils déterminent, ils agissent comme le fait l'acide lactique et ils permettent ou même ils peuvent appeler *loco læso* la multiplication du bacille pathogène.

1. On ne doit admettre qu'avec réserve l'hypothèse d'après laquelle le tétanos dit *médical* ou *spontané* reconnaîtrait souvent pour porte d'entrée le tube digestif lui-même. J'ai tenté à diverses reprises, même chez de très jeunes cobayes, de provoquer le tétanos en faisant avaler aux animaux des débris piquants (clous, fragments de verre), largement arrosés de culture tétanique. Jamais le tétanos ne s'est produit.

L'influence toxique relative de la quinine peut aussi entrer en ligne de compte, à titre d'agent favorisant général, lorsque, introduite directement dans le tissu cellulaire sous-cutané, elle est mise, dans sa totalité et très rapidement, en rapport avec les éléments défensifs de l'organisme et avec le système nerveux. Une autre raison, qu'il me reste à énoncer, filiale de la précédente, intervient sans doute aussi.

La quinine possède une action spéciale sur les leucocytes du sang. Binz, Scharrenbroich[1], ont vu que trois grammes de quinine, absorbés par un sujet pesant 60 kilogs, abaissent au quart du chiffre normal la proportion des globules blancs du sang. Cette hypoleucocytose dure plusieurs heures. Chez la grenouille, une dose égale à 1/5,000 du poids produit la paralysie des globules blancs est l'arrêt de la diapédèse.

Confirmés par Zahn et Kohler, Jerusalemsky, Maurel, ces résultats ont été contestés par d'autres, en particulier par Hayem. Il ne paraît pas douteux, cependant, que l'injection de quinine amène, chez l'homme, une hypoleucocytose notable. J'ai pratiqué plusieurs numérations des leucocytes chez trois sujets soumis à cette médication, en évitant les erreurs dues à la leucocytose alimentataire. J'ai constaté ce qui suit :

	NOMBRE DE LEUCOCYTES		
	(1)	(2)	(3)
Avant l'injection de quinine (0 gr. 60)...	9600	8100	6260
20′ à 30′ après l'injection..............	6300	3440	»
1 heure après........................	5900	4220	3130
7 heures après........................	8680	»	5680
24 heures après........................	9200	9300	9540

Chez les animaux (cobaye, lapin), j'ai également observé une hypoleucocytose très notable et presque immédiate, après l'injection de quinine. Le taux des leucocytes se réduit parfois de un tiers et même de moitié. Chez les animaux ayant reçu de fortes doses de quinine, les leucocytes paraissent avoir perdu leur mobilité. Cette action est encore plus facile à vérifier *in vitro*, lorsqu'on met une solution de quinine en contact avec du sang frais et qu'on examine ce sang au microscope. Une proportion de chlorhydrate neutre de quinine mélangée dans la proportion de 1/200 immobilise en quelques minutes les leucocytes qui n'adhèrent plus aux parois de la lame.

1. Cités par G. Hayem. *Leçons de thérap.*, t. I, p. 236

D'après Maurel, le bromhydrate neutre de quinine tue instantanément les leucocytes du sang dès qu'il est dans la proportion de 1 0/0. Il immobilise et *tue* les cellules blanches même la dose de 0gr,25 0/0 : or celle-ci est très inférieure à la dose toxique pour les animaux[1]. Cette action spéciale de la quinine, paralysante des leucocytes à doses faibles et leucocyticide à doses plus élevée, est significative. Elle fournit l'explication des effets favorisants très accusés que déterminent les injections des sels de quinine sur l'infection tétanique.

Au surplus, la quinine possède des propriétés chimiotaxiques négatives. Binz, Disselhorst, en arrosant le mésentère de grenouille avec des solutions de quinine ont vu s'arrêter la diapédèse des globules blancs. A leur sortie des vaisseaux, ces cellules reprennent leur mobilité. M. Metchnikoff explique ce phénomène par la chimiotaxie négative des leucocytes qui, quoique mobiles, ne se dirigent pas vers l'endroit arrosé par cette substance [2].

D'un autre côté, si l'on insère, sous la peau de l'oreille du lapin, des tubes capillaires renfermant des solutions, à divers degrés, de bichlorhydrate de quinine, il est facile de constater que le bouchon, situé à l'entrée du tube, n'est formé que d'albumine coagulée et de très rares leucocytes.

Bien qu'elle exerce, sur les leucocytes du lapin, une influence analogue à celle qu'elle a sur les autres animaux, la quinine est cependant, chez le lapin, dépourvue d'action favorisante. C'est que ce dernier présente normalement une résistance beaucoup plus considérable contre la toxi-infection tétanique.

Au contraire, chez l'homme, extrêmement sensible à cette intoxication (Nicolas), ainsi que chez les animaux également très réceptifs, tels que le cobaye et la souris, il est rationnel de penser que la lésion locale sous-cutanée provoquée par la quinine retient le bacille du tétanos, s'il a été apporté avec elle — et l'appelle ou le fixe s'il existe déjà, à l'état latent, dans l'organisme. D'autre part, les propriétés antileucocytaires et chimiotaxiques négatives que présentent les sels de quinine, ralentissent le rôle défensif des cellules polynucléaires, particulièrement aptes à l'englobement des spores et permettent ainsi la végétation du microbe.

1. Maurel, *Bull. de la Société de Biologie*, 1er novembre 1902 et 14 mars 1903.
2. Metchnikoff, *Leçons sur la pathol. comp. de l'inflammation*, Paris, 1902, p. 173

Les constatations qui précèdent paraissent devoir entraîner une conséquence pratique, applicable à l'homme. Chez les paludéens ayant eu antérieurement des plaies mal soignées ou des excoriations qui aient pu livrer passage au bacille du tétanos, il sera utile d'injecter préventivement du sérum antitétanique, en même temps que la solution de quinine.

COLORATION DES PROTOZOAIRES

ET OBSERVATIONS SUR LA NEUTROPHILIE DE LEUR NOYAU

Par le Dr F. MARINO

Avec la planche IX

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff)

Grassi [1] et Feletti ont le mérite d'avoir vu les premiers le noyau de l'hématozoaire du paludisme.

Ils mettaient une goutte d'une solution diluée de bleu de méthylène, faite dans de l'eau distillée, sur une lame et y déposaient une lamelle sur laquelle on avait prélevé une gouttelette de sang malarique. En relevant et réappliquant cette lamelle plusieurs fois de suite, ils ont pu voir la couleur se mélanger très bien au sang et colorer *fortement les granulations nucléaires* des parasites.

Romanowsky [2], plus tard, a démontré la coloration spécifique de la chromatine du noyau en se servant d'un mélange de bleu de méthylène et d'éosine.

L'auteur pense — sans preuve aucune — que ce mélange produit dans le tube à essai une troisième substance colorante neutre qui serait capable d'agir seulement à l'*état naissant* et qui aurait une très grande affinité pour la chromatine des noyaux.

Ziemann [3], qui a modifié la méthode de Romanowsky croit que la couleur neutre, due à un mélange de bleu et d'éosine, est soluble soit dans un excès de bleu, soit dans un excès d'éosine et qu'ainsi elle perd tout pouvoir colorant. Il est nécessaire donc, d'après Ziemann, d'obtenir par tâtonnement un certain mélange de deux matières colorantes dans lequel cette couleur neutre ne se dissout pas.

D'autres encore sont persuadés que le principe colorant actif de la chromatine existe dans le bleu de méthylène.

1. Grassi G. B., M. R. Feletti, Ueber einige Färbungsmethoden der Malaria parasiten. *Centr. f. Bakter.* 1891. Bd X, p. 519.
2. Romanowsky, Zur frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. *Petersb. medec. Wochenschr.* 1891.
3. Ziemann, *Ueber Malaria und andere Blutparasiten*, Iena, 1891.

Comme l'on voit, les idées de Romanowsky, Ziemann et autres sont assez vagues pour ne pas avoir la prétention d'expliquer sérieusement le mécanisme intime suivant lequel s'opère la coloration spécifique de la chromatine.

Nous avons étudié depuis longtemps cette question et toutes les recherches faites à cet égard, nous ont amené à conclure que les phénomènes qui se vérifient dans le protoplasma ne sont pas identiques à ceux qu'on observe dans le noyau.

Dans le premier, l'azur, couleur basique, reste combiné de telle façon qu'il ne peut pas attirer l'éosine, couleur acide, quand on fait agir cette couleur après la coloration obtenue avec l'azur.

Dans le noyau, les phénomènes de teinture sont différents. Ici, l'azur est fixé de telle manière qu'il peut attirer l'éosine et faire changer la coloration bleue de la masse nucléaire en coloration rouge rubis. (V. planche IX, fig. 4, n°s 7, 9′ 10′, et 11.)

Ces résultats de coloration, qu'on peut *expliquer différemment* et que nous avons vus, pour la première fois, dans le protoplasma et dans le noyau des protozoaires, sont applicables aussi au protoplasma et au noyau des lymphocytes, des gros mononucléaires, des plaquettes et d'autres cellules. Mais, à propos des lymphocytes et des gros mononucléaires, il faut observer que leur protoplasma devient *amphophile* au moment où l'on y voit paraître des granulations. (V. fig. 4, n°s 7, 7′, 9′, 9,.)

Nous admettons [1] deux espèces de groupements actifs, tant dans ces granulations que dans celles des leucocytes dits *macro* et *micrograπuleux* (éosinophiles et neutrophiles d'Ehrlich).

Le protoplasma des protozoaires, contrairement à celui des lymphocytes et des gros mononucléaires, *reste toujours basophile*.

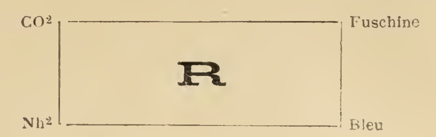
Avant d'aller plus loin, nous croyons très utile d'exposer les idées de M. Ehrlich sur la *neutrophilie*, en général.

M. Ehrlich considère tout corps neutrophile, et, dans le cas particulier, chaque granulation des noyaux des protozoaires comme résultant de deux espèces de groupements : acides et basiques. Les premiers ayant de l'affinité pour les couleurs basiques (basophiles), et les seconds pour les couleurs acides (acidophiles).

Pour mieux expliquer les idées d'Ehrlich, qui nous ont été

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, avril et mai 1903.

communiquées par lui-même, à l'occasion d'une visite qu'il a bien voulu nous faire dans notre laboratoire, représentons une



granulation chromatique neutrophile du noyau d'un trypanosome, par un rectangle où les groupements acides sont indiqués par CO^2 et par la fuschine et les groupements basiques par Nh^2 et par le bleu.

M. Ehrlich ne se contente pas d'admettre cette double espèce de groupements, que nous admettons, et avec grande réserve, pour les granulations amphophiles des lencocytes de l'homme et du singe, mais il croit encore que les groupements acides *par leur nombre et par leur force d'affinité vis-à-vis des matières colorantes sont tout à fait ou presque égaux aux groupements basiques*, c'est-à-dire que, si, dans une granulation chromatique, il y a 10 groupements acides, ayant 100 affinités pour les couleurs basiques, dans la même granulation il y aura environ 10 groupements basiques, ayant 100 affinités pour les couleurs acides. Voici pourquoi, (c'est M. Ehrlich qui parle) le réseau chromatique attire les couleurs neutres. Nous avons pensé souvent aux idées théoriques d'Ehrlich et nous avons tâché de voir s'il était possible d'en faire une rigoureuse démonstration chimique.

Malheureusement il nous est advenu le contraire.

Nous nous sommes demandé : Si les idées d'Ehrlich sont vraies, il doit être possible de colorer les granulations des noyaux des protozoaires, aussi bien avec les couleurs acides qu'avec les couleurs basiques. Eh bien, nos recherches faites avec des couleurs acides ont été *toujours négatives*, tandis que nous avons obtenu de très jolies colorations en nous servant des couleurs basiques (azur, bleu de méthylène).

Donc, il est tout naturel de penser que les groupements basiques de ces noyaux — s'ils existent — ne fonctionnent pas.

Ehrlich, qui précise le rapport numérique des groupements dans la constitution des noyaux, ne peut pas démontrer la raison du *non-fonctionnement d'une partie* de ces groupements.

Pour nous, un corps ayant deux espèces de groupements *actifs* est *toujours amphophile*.

Après avoir démontré que l'azur en solution aqueuse ou alcoolique, colore assez bien le protoplasme et le noyau des protozoaires, fixés dans l'alcool absolu, et que l'éosine en solution aqueuse très faible (1/20,000) les différencie, nous avons tâché de rendre ces deux couleurs plus sensibles en les unissant avec le bleu de méthylène, et obtenir ainsi de jolies préparations en très peu de temps.

Dans ce but, on mélange une solution aqueuse de bleu de méthylène et d'azur (bleu, 0gr,50; azur, 0gr,50; eau, 100 grammes) avec une solution aqueuse de carbonate de soude (0gr,50 0/0); puis, après un séjour de 24-48 heures à l'étuve à 37°, ou mieux au thermostat à une température plus élevée, on unit ce mélange avec une solution aqueuse d'éosine. Cette solution varie selon la qualité du bleu. Il faut l'établir par tâtonnement (0gr,10-0gr,25-0gr,30 0/0). Ensuite on filtre ce mélange et on obtient une poudre soluble dans l'eau et dans l'alcool méthylique.

C'est précisément cette poudre dissoute dans l'alcool méthylique qui sert dans notre coloration et qui agit avec une rapidité énorme, quand elle est au contact des protozoaires et neutralisée *sur la lamelle*, par une solution aqueuse d'éosine.

L'éosine, peut-être, dans ces conditions, agira-t-elle comme matière colorante, et aussi comme mordant.

Méthode de coloration.

On dissout le bleu préparé comme il vient d'être dit dans la proportion de 0gr,04 pour 20 c. c. d'alcool méthylique pur, et l'éosine dans la proportion de 0gr,05 en 1,000 d'eau.

Sur une lamelle de 18 millimètres contenant du sang avec des protozoaires, on met 4 petites gouttes (4/30 c. c.) qu'on fait agir 3 minutes précises et puis, sans laver, on laisse tomber sur le bleu 8-10 gouttes de la solution aqueuse d'éosine, qu'on fait agir 2 minutes.

Si les lamelles sont plus grandes (22 millimètres) on met une plus grande quantité de bleu (8-10 gouttes) et d'éosine (16-20 gouttes).

Si, au lieu de se servir de lamelles, on emploie des lames, on

met 1/4, 1/2 c. c. de la solution de bleu et 1/2,-1 c. c. d'éosine. On lave à l'eau, on sèche et on monte au baume.

Dans ces préparations, les globules rouges sont colorés en bleu ou en rouge, selon la quantité d'éosine qu'on y ajoute.

Quelquefois, pour certains protozoaires (trypanosomes des oiseaux, des poissons et autres), il faut prolonger l'action du bleu (4-5-10 minutes) et celle de l'éosine (8-10-20 minutes).

Du reste, on peut colorer ces mêmes trypanosomes assez vite si, après avoir fait agir le bleu quelques minutes, on y met l'éosine et qu'on porte ces préparations au thermostat à 56°.

Dans ces conditions il faut toujours empêcher l'évaporation des couleurs pour ne pas avoir de précipités.

A propos de la solution alcoolique de bleu, nous faisons observer qu'elle garde son pouvoir colorant spécifique pour les noyaux des protozoaires pendant 2 mois environ si l'alcool méthylique est pur. Dans le cas contraire, il faut la renouveler tous les 25-30 jours.

Pour colorer tous les microbes, fixés 3 fois à la flamme, on emploie seulement une solution aqueuse de bleu 1/500 qu'on fait agir 1/2-1 minute. On peut se servir aussi de la solution alcoolique de bleu qui reste toujours active.

Dans ce dernier cas, il est inutile de fixer les microbes à la chaleur.

EXPLICATION DE LA PLANCHE IX

Fig. 1. — Sang de rat à l'état frais. Coloration avec notre bleu 0gr,04/20 d'alcool méthylique pur. (Leitz 1/16, Imm. homog. oc. 3). — 1. Trypanosome Lewisi. — 2. Forme de division inégale du même Tryp. — 3. Division en rosace. — 4. Petit Tryp. détaché d'une rosace. — 5. Autre forme de division. — 6. Trypanosome du Nagana ou Tryp. Brucei.

Fig. 2. — 1. Trypanosome paddae. — 2. Try. ayant le noyau, le centrosome et la membrane ondulante colorés en bleu. — 3. Le même Tryp. ayant le noyau, le centrosome et la membrane ondulante colorés en rouge rubis. —

4. Globule rouge normal. — 5. Globule rouge contenant un petit halteridium (élément mâle). — 6. Globule rouge refermant un halteridium dans un état de développement plus avancé (élément mâle). — 7. Globule rouge contenant une petite forme d'halteridium (élément femelle). — 8. Globule rouge avec un halteridium plus développé que le précédent (élément femelle).

Fig. 3. — 1. Globule rouge ayant un petit protéosome. — 2. Globule rouge avec un proteosome dans lequel la chromatine est divisée en deux petits amas. — 3. Quatre petits protéosomes libres. —4. Globule rouge ayant un protéosoma en voie de division.

Fig. 4. — 1. Parasite libre de la fièvre quarte. — 2. Parasite endoglobulaire. — 3. Le même plus développé. — 4. Parasite qui a consumé toute l'hémoglobine et se trouve en voie de division. — 5. Formes libres. — 6. Lymphocyte sans granulations. — 7. Lymphocyte avec des granulations colorées en rouge. — 7′. Le même lymphocyte avec des granulations colorées en bleu. — 8. Mononucléaire sans granulations. — 9. Mononucléaire avec des granulations colorées en rouge. — 9′. Le même mononucléaire avec des granulations colorées en bleu. — 10. Plaquettes ayant le protoplasma et le noyau colorés en bleu. — 10′. Plaquettes ayant le protoplasma coloré en bleu et le noyau en rouge rubis. — 11. Leucocyte micrograπuleux parsemé dans tout son protoplasma par des granulations colorées en rouge rubis. — 11′. Le même leucocyte avec des granulations colorées en bleu.

Fig. 5. — 1. Parasite libre de la fièvre tierce. — 2. Parasite endoglobulaire. — 3. Le même dans un état de développement plus avancé et où l'on voit déjà la division de la substance chromatique en deux petits amas. — 4. Parasite dans un degré de division plus avancé. — 5. Formes libres.

Fig. 6. — 1. Sang de chien. — 2. Globules rouges contenant des piroplasma bigeminum. — 3. Formes libres de piroplasma.

Fig. 7. — 1. Sang de poule avec des spirilles de la fièvre récurrente.

Fig. 8. — 1. Diplocoques fixés trois fois à la flamme et colorés, pendant une demi-minute, avec une solution aqueuse (1/500) de bleu. 2. Bacilles de la diphtérie traités par le même procédé.

Importance de l'Examen bactériologique

PRATIQUÉ SUR LES CADAVRES

PAR LE Dr R. B. H. GRADWOHL

Instructeur d'anatomie pathologique à l'Université.

Médecin attaché au Parquet de Saint-Louis (Missouri) E. U. A.

Autrefois on pensait que l'examen bactériologique du sang des cadavres devait être d'un très grand secours, pour déterminer la cause de la mort; et de fait, les microbes spécifiques de plusieurs maladies infectieuses ont été découverts à l'étude du cadavre.

L'examen bactériologique du sang dans les cadavres a pour but de déterminer les bactéries qui s'y trouvent et leur rôle dans la production de la mort. Il cherche aussi à savoir parmi ces bactéries, lesquelles ont pénétré dans le sang pendant la période agonique et après la mort.

Plusieurs auteurs prétendent que dans les derniers moments de la vie et immédiatement après la mort, le corps est envahi par les différents micro-organismes de la putréfaction et que par conséquent, la présence d'une bactérie dans le sang du cœur n'est pas une preuve qu'elle ait causé la mort.

Récemment une ardente controverse s'est élevée sur ce point entre les docteurs Simmonds de Hambourg et Canon de Berlin.

Le docteur Simmonds, dans une étude approfondie publiée dans le *Virchows Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie* 175, n° 3, 1904), consigne les résultats de ses recherches bactériologiques sur le sang cardiaque de 1,200 cadavres.

Il arrive à cette conclusion que des données importantes peuvent être obtenues par l'examen bactériologique systématique du sang des cadavres. Sa principale expérience consiste à faire des cultures du sang cardiaque. Il prétend que les microbes dont il a démontré l'existence dans le sang du cœur, sont les microbes spécifiques qui peuvent être trouvés libres, dans le sang en circuation, pendant la vie, et non pas d'autres qui seraient venus de certaines parties du corps après la mort. Dans ces expériences,

les autopsies étaient pratiquées de 12 à 36 heures après la mort et même, quelquefois plus tard. De plus, l'expérimentateur prétend reconnaître les différents microbes d'invasions scondaires et cependant dans 95 0/0 de ces essais,une seule variété s'y rencontrait : le streptococcus.

Les causes déterminantes de la mort du sujet dans le sang duquel se retrouvait le streptococus étaient : la scarlatine (88 cas), la diphtérie (38 cas), la phtisie (28 cas), l'érysipèle (25 cas), phlegmons ou phlébite (29 cas), la pyémie, la septicémie, l'endocardite maligne (38 cas), enfin diverses maladies infectieuses. Le docteur Simmonds déclare, qu'excepté dans les cas de complications entraînant la mort, l'examen du sang restait sans résultats dans les cas d'alcoolisme chronique, de leucémie, d'anémie pernicieuse, de diabète, de marasme sénile, enfin dans les maladies chroniques du système nerveux et de l'appareil circulatoire.

Le docteur Canon dans des publications dont la dernière parut dans le *Centrablatt fur Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie* (XV, n° 4, 1904), jeta un premier doute sur la réalité de cette théorie. La principale critique que fait ce dernier au docteur Simmonds, est qu'il a employé le sang cardiaque au lieu du sang des veines périphérique, entre autres celui de la veine *media basilica*. Le docteur Canon prétend que deux cultures faites en même temps, l'une avec le sang de la veine périphérique, l'autre avec celui du cœur, montreront, dans certains cas, de grandes différences, c'est-à-dire, qu'aucun microbe ne sera trouvé dans le sang veineux et qu'un très grand nombre sera rencontré dans le sang du cœur. Au dire du docteur Canon, ces bactéries, dans presque tous les cas, ont émigré des organes voisins, et surtout des poumons.

Le fait que le docteur Simmonds dans les cas de tuberculose des poumons a trouvé si fréquemment des *streptococcus* dans le sang cardiaque seulement, semble fournir le principal argument de son adversaire : savoir que les cavités pulmonaires de ces malades tuberculeux sont le refuge de nombreuses espèces de bactéries qui, durant la période agonique ou après la mort, passent dans le cœur. L'opinion du docteur Canon est qu'on peut obtenir d'excellents renseignements des recherches bactériologiques pratiquées sur les cadavres, mais pas en ensemençant le

sang cardiaque. De même il croit pouvoir affirmer que non seulement les bactéries de la décomposition commencent leur travail dans le cœur, mais qu'en plus, celles qui ordinairement résidaient dans les poumons, le foie et les viscères, doivent naturellement et en raison même de la proximité du cœur, envahir cet organe dans les derniers instants de la vie, ou immédiatement après la mort. Les observations bactériologiques deviennent de ce fait encore plus difficiles.

A l'appui de son dire, le docteur Canon cite le cas suivant : Un sujet dont la jambe entière avait été écrasée dans un accident, fut amputé à la jointure de la hanche ; il mourut d'une pyémie. L'examen du sang avant et après la mort n'amena aucun résultat. L'autopsie 24 heures plus tard montra de la gangrène des poumons à la suite d'un *infarctus*. L'examen du sang cardiaque prouva l'existence de nombreux microbes de la putréfaction et du *streptococcus*. Tous ces microbes venaient des poumons sans aucun doute, puisque durant la vie il n'y en avait pas un seul dans le sang en circulation. Le docteur Eiselsberg a corroboré ces résultats par des expériences sur le sang cardiaque moins de 10 minutes après la mort du sujet.

De plus, la théorie du docteur Canon est confirmée par les expériences des docteurs Achard et Phulpin faites sur 49 sujets. Ils se servaient de sang cardiaque, de sang de la veine du bras et enfin de sang obtenu par ponction du foie ; l'étude du foie et de la rate était faite à l'autopsie. Dans huit de ces cas, aucune bactérie ne fut rencontrée dans le sang veineux du bras, tandis que leur présence fut toujours signalée dans le sang provenant de la ponction du foie.

Dans 6 de ces cas le sang cardiaque était stérile pendant les 10 premières heures après la mort ; 18 à 24 heures après, les mêmes espèces signalées dans le sang retiré du foie (*bacillus coli communis*, *staphylococcus* et bacilles de la décomposition) étaient retrouvés dans le sang cardiaque. Dans les autres cas, peu de temps après la mort, ils remarquèrent dans le sang cardiaque les mêmes bactéries observées déjà dans le sang du bras, bien que les cultures de sang cardiaque quelques heures plus tard aient montré la présence des bacilles de la putréfaction.

Inspiré par les travaux de ces savants et par les expériences faites sur les animaux par les Drs Wurtz, Beco, Chvostek, Hau-

ser et Birsch-Hirschfeld, j'ai entrepris une série de cultures pour déterminer exactement quels sont les microbes trouvés dans les cadavres après la mort. Mes sujets sont ceux dont j'ai pratiqué les autopsies sous la direction du « coroner » de Saint-Louis (Mo), le Dr Robert Funkhouser, à la courtoisie duquel je dois les résultats que j'ai obtenus. Je crois pouvoir dire que dans la plupart de ces cas j'ai eu des renseignements plus précis que ne pouvaient l'être ceux des Drs Simmonds et Canon, en raison de la facilité qui m'a été donnée d'observer les sujets aussitôt après leur mort.

En vertu des lois allemandes, les corps doivent être conservés un certain nombre d'heures avant que l'autopsie puisse être pratiquée. Quoique le Dr Simmonds prétende que la conservation des corps dans le caveau de l'hôpital prévient toute décomposition, je crois pouvoir maintenir que le meilleur résultat dans ce genre d'expériences est donné par les autopsies faites dans le plus bref délai après la mort. Un autre avantage, c'est que les sujets sont conservés, à la morgue de Saint-Louis, dans des réfrigérateurs parfaitement aménagés qui, à mon avis, sont très supérieurs au système des caveaux en usage dans la Morgue allemande. Mes expériences personnelles sur l'examen bactériologique du sang veineux du bras et du sang cardiaque ont été faites sur 50 cas. Le sang était recueilli dans la veine *media basilica* à la façon dont on prend les cultures sur les sujets vivants ; il était ensuite ensemencé dans l'agar-agar liquéfié, qui était maintenu à la température de 30°. Le sang cardiaque était obtenu par la méthode de Schottmueller : après l'incision du péricarde, une partie de la surface du ventricule droit est stérilisée par une lame de scalpel chauffée à blanc, une canule stérilisée est introduite dans le ventricule et le sang est aspiré dans une seringue également stérilisée. Plusieurs gouttes de ce sang (de 1 à 30) sont introduites dans des tubes d'agar-agar liquéfié, on agite, puis on verse dans des boîtes stérilisées de Petri pour la culture.

Les autopsies dont je donne les résultats ci-dessous ont été faites dans certains cas moins de 2 heures après la mort.

La cause de la mort de mes sujets était les suivantes :

7 cas de blessure d'armes à feu (3 à la poitrine, 2 au ventre 2 à la tête) ;

1 cas de fracture de l'os frontal avec hémorragie cérébrale ;

2 cas de fracture de la base du crâne ;

10 cas de maladie des valvules du cœur ;

3 cas d'hémorhragie par suite de la rupture d'un anévrisme de l'aorte ;

1 cas d'empoisonnement par l'acide oxalique ;

1 cas de pyémie provenant d'accident ;

4 cas de pneumonie lobaire ;

1 cas de péritonite à la suite de perforations intestinales (coup de couteau) ;

1 cas de fracture compliquée du crâne ;

1 cas de cancer du sein et du foie ;

2 cas de péritonite purulente à la suite d'avortement criminel ;

2 cas de pneumonie traumatique, causée par fractures des côtes ;

1 cas de blessure d'arme à feu à la cuisse, amputation et septicémie ;

1 cas d'enfant mort-né ;

3 cas de dégénérescence graisseuse du cœur ;

1 cas d'empoisonnement par la morphine ;

1 cas de méningite cérébrale ;

1 cas de péritonite à la suite de perforation d'un ulcère typhoïde ;

6 cas de néphrite.

Les sept cas de blessures par armes à feu ont causé la mort presque instantanément.

Dans ces différents cas, j'ai noté la présence des bactéries dans les conditions suivantes :

Un examen du tableau ci-après montrera que sur ces 50 cas les cultures du sang cardiaque ont donné des résultats positifs dans 39 cas et des négatifs dans 11. En d'autres termes, dans 78 % de ces cas, des bactéries ont été trouvées dans le sang cardiaque, bien qu'il fut évident qu'elles n'étaient pas présentes dans le sang durant la vie. Au contraire, l'absence de microbes a généralement été remarquée dans les cultures du sang de la veine du bras, sauf dans quelques cas d'infection générale avant la mort. Dans ces conditions, les mêmes bactéries qui avaient été trouvées dans le pus de la partie infectée se sont rencontrées

CAUSE DE LA MORT	TEMPS entre la mort et l'autopsie.	BACTÉRIES trouvées dans le sang cardiaque.	BACTÉRIES trouvées dans la veine du bras.
1. Blessure d'armes à feu, à la poitrine.	4 heures	Streptococcus.	0
2. — — — —	6 —	Streptococcus et staphylococcus.	0
3. — — — —	2 —	0	0
4. — — — au ventre...	4 —	0	0
5. — — — —	8 —	Streptococcus.	0
6. — — — à la tête....	10 —	Proteus vulgaris et staphylococcus.	0
7. — — — —	3 —	Streptococcus et B. subtilis.	0
8. Fracture de l'os frontal avec hémorrhagie cérébrale.................. ..	7 —	Streptococcus.	0
9. Fracture à la base du crâne...	5 —	0	0
10. — — —	8 —	Streptococcus, B coli communis et staphylococcus.	0
11. Maladie des valvules du cœur	3 —	0	0
12. — — —	7 h. 1/2	Staphylococcus.	0
13. — — —	9 heures	B. coli communis, B. mesentericus et streptococcus.	0
14. — — —	6 —	B. coli communis et B. subtilis.	0
15. — — —	6 —	Proteus vulgaris.	0
16 — — —	10 —	Streptococcus.	0
17. — — —	3 —	0	0
18. — — —	2 h. 1/2	Staphylococcus.	0
19. — — —	8 —	B. coli communis.	0
20. — — —	4 —	Streptococcus.	0
21. Rupture d'un anévrisme de l'aorte (hémorrhagie)......	6 —	B. coli communis et staphylococcus.	0
22. Rupture d'un anévrisme de l'aorte (hémorrhagie).....	7 —	Streptococcus et B. subtilis.	0
23. Rupture d'un anévrisme de l'aorte (hémorrhagie).........	3 —	0	0
24. Empoisonnement par l'acide oxalique.	11 —	Streptococcus.	0
25. Pyémie......................... ..	8 —	Staphylococcus pyogenes aureus.	Staphylococcus p. aureus
26. Pneumonie lobaire..................	5 —	Pneumococcus et streptococcus.	0
27. — —	6 —	0	0
28. — —	7 —	Streptococcus. B. subtilis et staphylococcus.	0
29. — —	4 h. 1/2	Streptococcus.	0
30 Péritonite à la suite de perforation des intestins (coup de couteau)........	5 heures	Staphylococcus et B. coli communis.	0
31. Fracture compliquée du crâne	2 —	Streptococcus.	0
32. Cancer du sein et du foie............	5 —	B. coli communis et B subtilis.	0
33. Péritonite à la suite d'avortement criminel............	3 —	Streptococcus et staphylococcus.	Streptococcus.
34. Péritonite à la suite d'avortement criminel	7 —	B. coli communis et staphylococcus.	0
35. Pneumonie traumatique causée par fractures des côtes..................	5 —	0	0
36. Pneumonie traumatique causée par fractures des côtes..................	8 —	B. coli communis, pneumococcus et streptococcus.	0
37. Blessure d'armes à feu à la cuisse (septicémie).....................	4 —	Streptococcus.	Streptococcus.
38. Enfant mort-né.....................	8 —	Staphylococcus.	0
39. Dégénérescence graisseuse du cœur..	6 —	0	0
40. — — — ..	3 —	Streptococcus.	0
41. — — — ..	9 —	B. coli communis et Proteus vulgaris.	0
42. Empoisonnement par la morphine....	5 —	0	0
43. Méningite cérébrale............. ...	4 h. 1/2	Streptococcus.	0
44. Péritonite à la suite d'un ulcère typhoïde..................	3 heures	B. coli communis.	0
45. Néphrite.......	10 —	Staphylococcus et streptococcus.	0
46. —	8 —	Staphylococcus, B. coli communis et B. subtilis	0
47. —	7 h. 1/2	B. pyocyaneus et streptococcus	0
48. —	9 heures	Streptococcus et sarcina lutea.	0
49 —	3 —	0	0
50. —	8 —	Streptococcus.	0

dans le sang veineux du bras. Ce résultat constamment négatif de l'examen du sang de la veine *medica basilica* montre clairement que dans cette partie, il n'y a pas émigration des microbes après la mort. De même, la présence presque constante de *streptococcus* et de *bacillus coli communis* dans le sang cardiaque indique un envahissement du cœur pendant les derniers instants de la vie par les bacilles des organes voisins : des poumons, du foie et des intestins. Par conséquent, les renseignements obtenus par un examen bactériologique du sang cardiaque après la mort ne doivent pas être acceptés sans contrôle.

Je crois que les renseignements les plus sérieux sont procurés par l'examen bactériologique, après la mort, du sang provenant de la veine *media basilica*. Par exemple, Canon a répété souvent que, dans les cas médico-légaux, le pathologiste est incapable de trouver la cause déterminante de la mort. Tous les organes vitaux semblent normaux. Un examen bactériologique du sang du bras montrera une infection due aux *streptococcus* qui ne laisse aucune marque visible à l'œil nu sur les principaux organes.

BIBLIOGRAPHIE

1) *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie*, Bd 37, S. 571.
2) *Wiener klin. Wochenschrift*, 1890, nº 38.
3) *Arch. de med. expériment.*, Ser. 1, t. VII, 1895.
4) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1892.
5) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. IX.
6) *Wiener Klin. Wochenschrift*, 1896, nº 46.
7) *Zeitschrift für Heilkunde*, Bd 18, s. 421.
8) *Ziegler Beitrage*, Bd 24, S. 304.
SIMMONDS. *Virchows Archiv.*, Bd 175, Hft 3, 1904.
CANON. *Centralblatt für Allgemeine Pathologie*, Bd 15, nº 4, 1904.

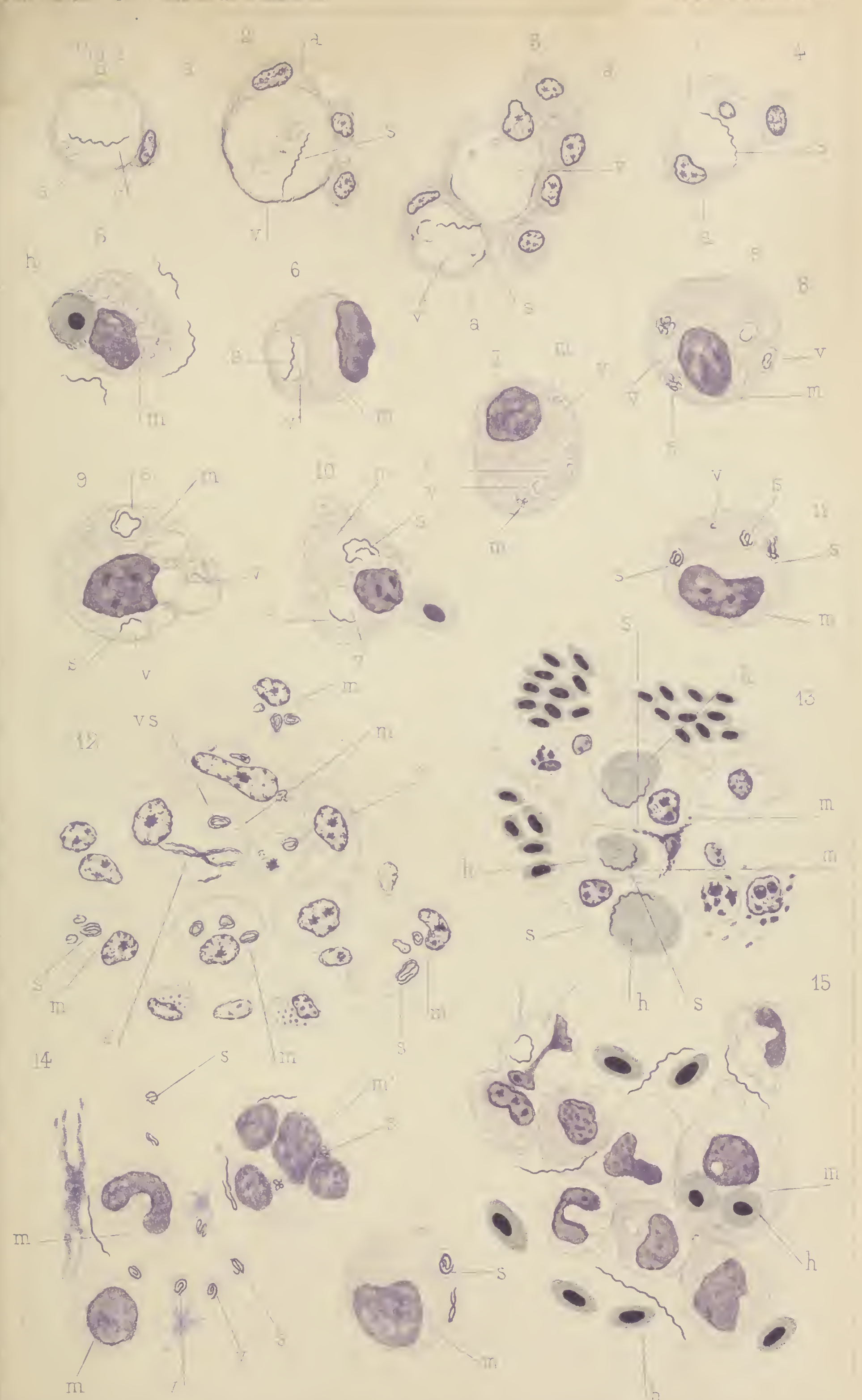
TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TABLE DES PLANCHES

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.



Levaditi del. Imp. d'Art, E. Pétain... Paris E. Remy lith.











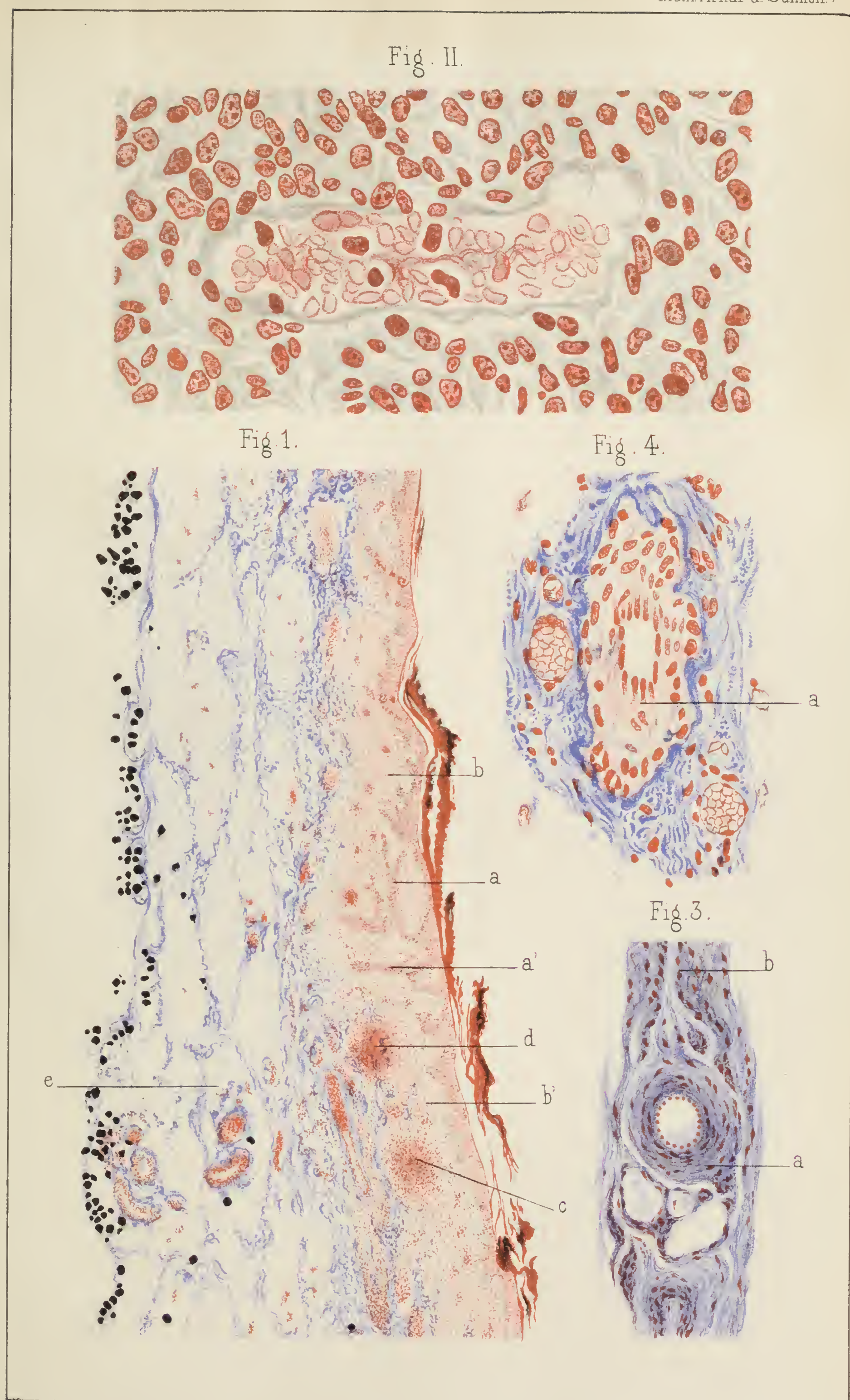


Institut Pasteur, Ph.

Photo Larger, 13, rue Chapon, Paris



E Remy, del. & lith.
Imp. L. Lafontaine, Paris



E. Remy, del. & lith
Imp. L. Lafontaine, Paris.



E. Remy del. & Lith. *Imp. L. Lafontaine, Paris*



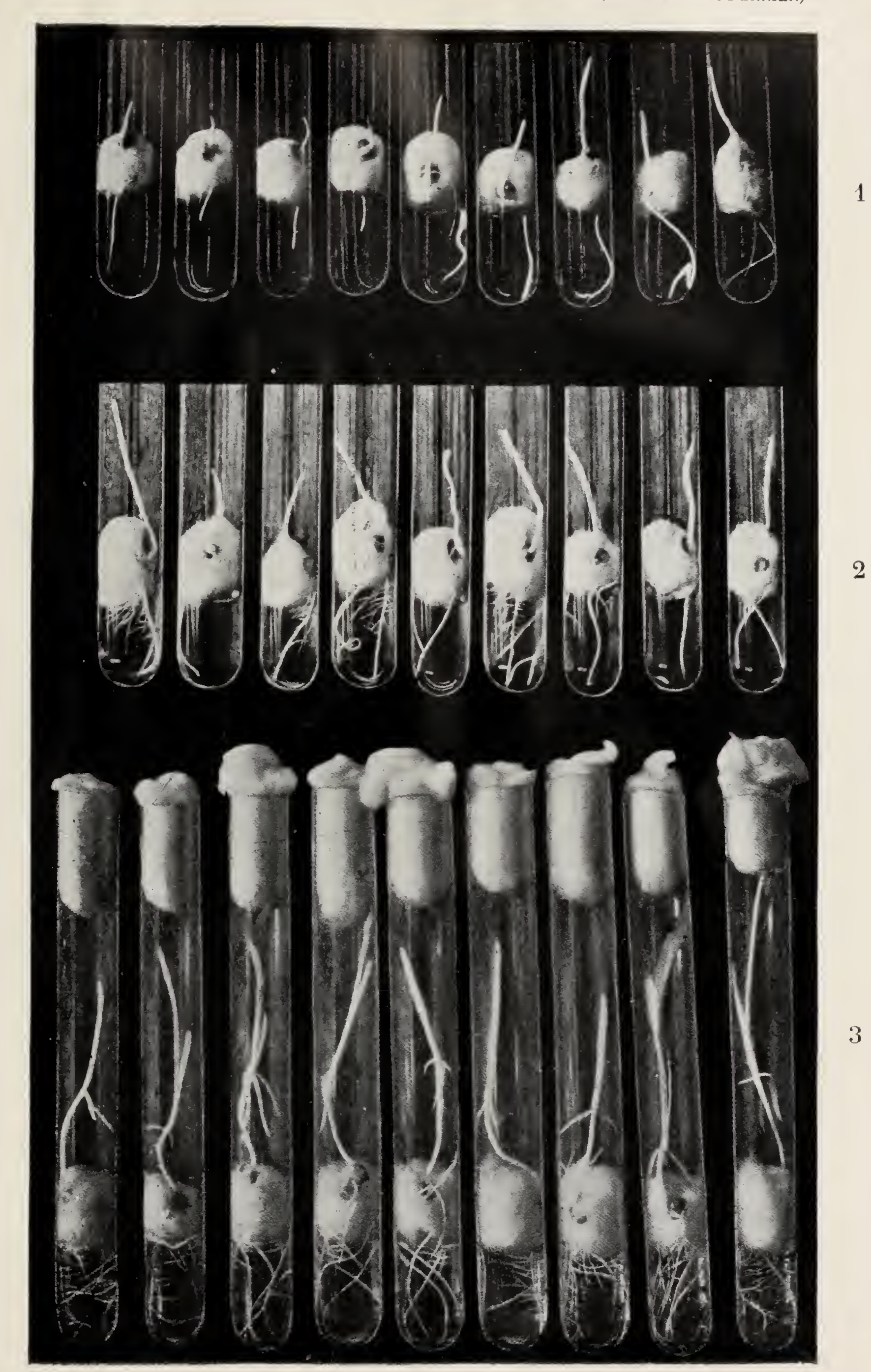
Fig. 9



Fig. 10.

E Remy del & lith.

Imp. J. Lafontaine, Paris.



1

2

3

Imp. Bouchet, Cusset.

VOL. XVIII — PL. VIII
(Mém. MAZÉ et PERRIER)

V. Roussel, Phot.

Imp. Bouchet, Cusset.

1_1 1_2 1_3 1_4 1_5 1_6

2_1 2_2 2_3 2_4 2_5 2_6 2_7 2_8

3_1 3_2 3_3 3_4

4_1 4_2 4_3 4_4 4_5 4_6 4_7 $4_{7'}$

4_8 4_9 $4_{9'}$ 4_{10} $4_{10'}$ 4_{11}

5_1 5_2 5_3 5_4 5_5 8 $4_{11'}$

6_1 6_2 7

Dr Marino, del.

V. Roussel lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.

